

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Dpto. Biología Molecular

Tesis Doctoral

**Papel de FAS y p21 en la limitación de las
células T de memoria y la enfermedad autoinmune**

Cristina Vázquez Mateo

Madrid

2012

A Carlitos

A mis padres

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección del Dr. Dimitrios Balomenos.

Parte de este trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Patología de la Universidad de California, San Francisco, (UCSF), bajo la dirección del Dr. Abul K. Abbas.

ABREVIATURAS	1
---------------------	----------

SUMMARY	5
----------------	----------

INTRODUCCIÓN	7
---------------------	----------

1. Introducción al sistema inmune	9
1.1. Inmunidad innata	9
1.2. Inmunidad adquirida	9
2. Células T	10
2.1. Funciones y tipos de células T	10
2.2. Mecanismos moleculares que subyacen a la activación del TCR	12
2.2.1. Ruta de las MAP quinasas	13
2.2.2. Ruta de NF- κ B	14
3. Tolerancia y autoinmunidad	15
3.1. Tolerancia central	16
3.2. Tolerancia periférica	16
3.2.1. FAS y la ruta apoptótica	18
4. Patologías autoinmunes	20
4.1. Ratones <i>lpr</i> , enfermedad autoinmune tipo lupus	20
4.2. Los ratones deficientes en FADD y C-8 no explican el fenotipo de los ratones <i>lpr</i>	21
4.3. Enfermedades autoinmunes humanas: ALPS y lupus	23
5. Ciclo celular y tolerancia periférica	23
5.1. El ciclo celular	23
5.2. p21 y su implicación en la tolerancia periférica	24

OBJETIVOS	27
------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS	33
-----------------------------	-----------

1. Cepas de ratones	35
2. Cultivos celulares	35

2.1. Medios de cultivo	35
2.2. Aislamiento de células T CD4 ⁺ de ratón	36
2.3. Obtención de células dendríticas de médula ósea de ratón	36
2.4. Protocolo de estimulaciones repetidas <i>in vitro</i>	37
2.5. Cultivos mixtos de células T CD4 ⁺ y células presentadoras de antígeno	38
3. Transferencia adoptiva de células T CD4⁺	39
4. Citometría de flujo	40
4.1. Marcaje extracelular	40
4.2. Citoquinas intracelulares	41
4.3. Anexina	42
5. Ensayos de proliferación <i>in vitro</i>	42
5.1. Incorporación de timidina tritiada	42
5.2. Marcaje con CFSE	42
5.3. Incorporación de BrdU	43
5.4. Tinción de ciclo celular	43
5.5. Conteo de células	43
6. Ensayos Bioquímicos	44
6.1. <i>Western blot</i>	44
6.2. Ensayo de retardo en gel (EMSA)	44
7. Análisis serológicos e histológicos	45
7.1. Anticuerpos anti-ADN en suero.....	45
7.2. Cortes parafinados de riñones de ratón	46
7.3. Evaluación del grado de glomerulonefritis	47
7.4. Inmunofluorescencia en criocortes de riñón	47
7.5. Medida de citoquinas en sobrenadante	47
8. Estadística	48

RESULTADOS..... 51

1. Fenotipo de los ratones C57BL/6-<i>lpr</i>.....	53
1.1. Hiperplasia de los órganos linfoides secundarios y acumulación de células T doble negativas hiperproliferativas en ratones <i>lpr</i>	53

1.2. Ventaja proliferativa de las células T CD4 ⁺ y T CD4 ⁺ de memoria <i>lpr in vivo</i> ...	55
2. Estudio de la proliferación de las células T CD4⁺ <i>lpr in vitro</i>	56
2.1. Una primera estimulación <i>in vitro</i> no genera diferencias proliferativas entre las células T CD4 ⁺ <i>lpr</i> y control.....	56
2.2. Hiperproliferación de las células T CD4 ⁺ deficientes en FAS durante una segunda estimulación <i>in vitro</i>	57
2.3. FAS regula negativamente la proliferación de las células T CD4 ⁺ durante una re-estimulación sin inducción de apoptosis.....	59
3. La hiperproliferación de las células T CD4⁺ <i>lpr</i> durante una estimulación repetida <i>in vitro</i> depende de su hiperactivación	62
3.1. La ventaja proliferativa de las células T CD4 ⁺ <i>lpr</i> está asociada a una hiperactivación de NF- κ B.....	62
3.2. FAS regula negativamente la activación de ERK-1/2 durante una estimulación repetida	65
3.3. Relación entre las células de T memoria y la hiperproliferación de las células T CD4 ⁺ <i>lpr</i>	67
4. Hiperproliferación de las células T CD4⁺ <i>lpr</i> durante una estimulación repetida con antígenos específicos	69
4.1. Ventaja proliferativa de las células CD4 ⁺ TCRtg <i>lpr</i> re-estimuladas con antígenos específicos <i>in vitro</i>	70
4.1.1. Las células CD4 ⁺ TCRtg <i>lpr</i> y control tienen una proliferación similar durante una primera estimulación con antígenos específicos.....	70
4.1.2. Ventaja proliferativa de las células CD4 ⁺ TCRtg <i>lpr</i> durante una 2 ^a estimulación con un antígeno específico de baja afinidad	71
4.1.3. Hiperproliferación de las células CD4 ⁺ TCRtg <i>lpr</i> en una re-estimulación sin inducción de apoptosis.....	74
4.1.4. La hiperproliferación de las células CD4 ⁺ TCRtg <i>lpr</i> re-estimuladas con un péptido de baja afinidad depende de NF- κ B.....	75

4.2. Ventaja proliferativa de las células CD4 ⁺ TCRtg <i>lpr</i> re-estimuladas <i>in vivo</i>	75
4.2.1. Ausencia de apoptosis en células CD4 ⁺ TCRtg re-estimuladas <i>in vivo</i>	76
4.2.2. Hiperproliferación de las células CD4 ⁺ TCRtg <i>lpr</i> tras una estimulación repetida <i>in vivo</i>	77
5. Influencia de p21 en el desarrollo de autoinmunidad en los ratones <i>lpr</i>.....	79
5.1. La sobre-expresión de p21 en células T <i>lpr</i> disminuye su proliferación y el desarrollo de autoinmunidad.....	79
5.1.1. La hiperproliferación de las células T CD4 ⁺ <i>lpr in vitro</i> disminuye al expresar el transgén de p21.....	80
5.1.2. Los niveles altos de p21 inhiben la activación y proliferación de las células T DN en los ratones <i>lpr</i>	81
5.1.3. La sobre-expresión de p21 reduce la activación y acumulación de células T CD4 ⁺ de memoria en ratones <i>lpr</i>	82
5.1.4. Reducción de las manifestaciones autoinmunes en los ratones C57BL/6- <i>lpr</i> -p21tg y MRL- <i>lpr</i> -p21tg.....	84
5.1.5. La sobre-expresión de p21 rescata la elevada incidencia de muerte de los ratones MRL- <i>lpr</i>	85
5.2. La ausencia de p21 agrava la patología autoinmune de los ratones <i>lpr</i>	86
5.2.1. La falta de p21 incrementa la activación y proliferación de las células T CD4 ⁺ <i>lpr in vitro</i>	86
5.2.2. Mayor activación de las células T CD4 ⁺ y T CD4 ⁺ de memoria en los ratones <i>lpr</i> -p21 ^{-/-} vs. <i>lpr</i>	88
5.2.3. La ausencia de p21 agrava la enfermedad autoinmune de los ratones <i>lpr</i>	90
5.2.4. La falta de p21 reduce la supervivencia de los ratones <i>lpr</i> en fondo C57BL/6.....	91
DISCUSIÓN	93
1. Ratones <i>lpr</i> , más allá del papel pro-apoptótico de FAS.....	95
2. FAS ejerce una regulación negativa de la proliferación de las células T estimuladas de manera repetida.....	96

3. Relación entre hiperproliferación e hiperactivación en las células T <i>lpr</i> de memoria.....	98
3.1. Hiperactivación de NF- κ B y ERK-1/2 en las células T CD4 ⁺ <i>lpr</i> durante una estimulación repetida.....	98
3.2. Elevada producción de citoquinas pro-inflamatorias en las células T CD4 ⁺ <i>lpr</i> de memoria.....	99
4. Implicación de FAS en la respuesta a antígenos de baja afinidad.....	101
5. Modelo del papel ejercido por FAS en el establecimiento de tolerancia.....	102
6. El control de la activación y proliferación de las células T <i>lpr</i> ejercido por p21 influye en el desarrollo autoinmunidad.....	104
6.1. La reducción de la proliferación de las células T <i>lpr</i> con el transgén de p21 disminuye la autoinmunidad	104
6.2. La falta de p21 exacerba la enfermedad autoinmune de los ratones <i>lpr</i>	105
7. Conclusión final.....	107

CONCLUSIONES	109
--------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	113
--------------------	-----

AGRADECIMIENTOS	127
-----------------------	-----

ADN	ácido desoxirribonucleico
Ag	antígeno
AICD	muerte celular inducida por activación (del inglés, <i>Activation Induced Cell Death</i>)
ALPS	síndrome autoinmune linfoproliferativo (del inglés, <i>Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome</i>)
AP- 1	proteína activadora-1 (del inglés, <i>Activator Protein-1</i>)
APC	célula presentadora de antígeno (del inglés, <i>Antigen-Presenting Cell</i>)
A96I	péptido agonista de baja afinidad para el TCR (sintetizado por sustitución de alanina por isoleucina en la posición 96 del péptido PCC: KAERADLIYLKQATAK)
BAY 11-7082	del inglés, <i>(E)-3-(4-Methylphenylsulfonyl)-2-propenenitrile</i>
BrdU	5-bromo-2' deoxiuridina
BSA	albúmina de suero bovino (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
B7	moléculas co-estimuladoras CD80/CD86
C-8	caspasa-8
CDK	quinasa dependiente de ciclina
CFA	adyuvante completo de Freund (del inglés, <i>Complete Freund's Adjuvant</i>)
CFSE	del inglés, <i>5-6-carboxifluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CMF	citometría de flujo
conA	concanavalina A
CTLA-4	del inglés, <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DAPI	del inglés, <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DC	célula dendrítica (del inglés, <i>Dendritic Cell</i>)
DD	dominio de muerte (del inglés, <i>Death Domain</i>)
DED	dominio efector de muerte (del inglés, <i>Death Effector Domain</i>)
DISC	del inglés, <i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DN	células T Doble Negativas (B220 ⁺ TCR β ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético (del inglés, <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)

ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, <i>Enzyme-linked WIm-munosorbent Assay</i>)
EMSA	ensayo de retardo en gel (del inglés, <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)
ERK	del inglés, <i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FADD	del inglés, <i>FAS Associated Death Domain</i>
FAS-L	FAS ligando
FCS	suero de ternera fetal (del inglés, <i>Fetal Calf Serum</i>)
FLIP	del inglés abreviado, <i>caspase-8 (FLICE)-Like Inhibitor Protein</i>
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés, <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
HEV	vénulas endoteliales altas (del inglés, <i>High Endothelial Venules</i>)
hrIL-2	interleuquina 2 recombinante de humano (del inglés, <i>human recombinant inter-leukin-2</i>)
IFA	adyuvante incompleto de Freund (del inglés, <i>Incomplete Freund's Adjuvant</i>)
IFN-γ	Interferón- γ
IκBα	inhibidor alpha de NF- κ B
IKK	kinasa del inhibidor I κ B α
IL-2	interleuquina-2
IL-17	interleuquina-17
IP	Ioduro de Propidio
ITAM	del inglés, <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
JNK	quinasa N-terminal c-Jun (del inglés, <i>c-Jun N-terminal</i>)
LAT	del inglés, <i>Linker for Activation of T cells</i>
LES	lupus eritematoso sistémico
<i>lpr</i>	del inglés, <i>linphoproliferation</i>
MAP quinasa	del inglés, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MKK	quinasas de las MAP quinasas

NFAT	factor de transcripción nuclear de células T (del inglés, <i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>)
NF-κB	factor de transcripción nuclear <i>kappa</i> B (del inglés, <i>Nuclear Factor kappa B</i>)
PBS	tampón fosfato salino (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCC	citocromo c de paloma (del inglés, <i>Pigeon Cytochrome C</i>). (péptido agonista de alta afinidad para el TCR: KAERADLIAYLKQATAK)
PD-1	del inglés, <i>Programmed cell Death-1</i>
PI3K	fosfatidil inositol 3-quinasa
PKC	proteína kinasa C
PMA	del inglés, <i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate</i>
poli(dI-dC)	del inglés, <i>polydeoxy (Inosinate-Cytidylate Acid), Sodium Salt</i>
Rb	retinoblastoma
TA	temperatura ambiente
TCR	receptor de células T (del inglés, <i>T Cell Receptor</i>)
TCRtg	receptor de células T transgénico
Tfh	célula T colaboradora folicular (del inglés, <i>follicular helper T cell</i>)
Tg	transgénico
TNF	del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Th	célula T colaboradora, (del inglés, <i>helper T cell</i>)
Treg	célula T reguladora
U0126	del inglés, <i>1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene</i>
z-VAD	del inglés, <i>benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone</i>

The extraordinary capacity of the immune system to prevent responses elicited by self antigens is known as self tolerance, and is essential for the maintenance of immune homeostasis. The processes of T cell activation, proliferation and cell death must be precisely regulated to avoid the development of autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus or autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS).

The FAS receptor has classically been associated with a role in apoptosis. Mice with defects in FAS (*lpr*) and ALPS patients both show a clear loss of tolerance that leads to autoimmunity and development of lymphadenopathy, with marked T cell hyperproliferation of unknown origin. FAS-dependent activation induced cell death (AICD) was initially considered the basis of the *lpr* mouse phenotype. Nevertheless, although the role of FAS-mediated cell death is well established *in vitro*, its relevance in apoptosis induction *in vivo* is debated. Defective apoptosis alone does not account for accumulation of activated T cells; clear evidence is derived from the analysis of mice deficient in other molecules involved in the FAS-activated apoptotic pathway, such as FADD (*FAS Associated Death Domain*) or C-8 (caspase-8). These mice lack T cell apoptosis but, unlike *lpr* mice, develop neither autoimmune disease nor lymphadenopathy but are affected by immunodeficiency. This suggests that, in addition to apoptosis, FAS might have other functions in homeostasis control.

Since *lpr* T cells hyperproliferate *in vivo* and their apoptotic defects are nonetheless insufficient to justify the lymphadenopathy and autoimmunity observed in these mice, we explored the relationship between loss of tolerance and the excessive proliferation of autoreactive T cells in *lpr* mice. Our results showed that, in addition to its proapoptotic effect, the FAS receptor is a crucial regulator of activation (NF- κ B, ERK-1/2, pro-inflammatory cytokines) and proliferation in activated/memory T cells generated after repeated stimulation by an antigen with low affinity for the TCR (T cell receptor).

We have described p21 as a suppressor of autoimmunity, shown by its implication in the control of apoptosis-surviving T cell proliferation after secondary antigen challenge. This led us to speculate that p21 overexpression in *lpr* mice might reduce the autoimmune disorder, since their T cells hyperproliferate after restimulation. Our data indicate that a reduction in memory T cell proliferation, mediated by T cell-directed p21 overexpression, efficiently reduces lymphadenopathy and disease manifestations in *lpr*-p21tg mice. In accordance with these results, *lpr*-p21^{-/-} mice showed excessive memory T cell activation/proliferation, leading to severe autoimmune disease and an increased early mortality rate compared to *lpr* mice. T cell hyperproliferation thus has evident physiological relevance in autoimmunity development in FAS-deficient mice.

We propose that both FAS and p21 have an essential function in tolerance establishment, mediated by their functions as negative regulators of memory T cell activation/proliferation.

INTRODUCCIÓN

“Cada día sabemos más y entendemos menos”

Albert Einstein. Científico alemán (1879-1955).

<i>apoptosis</i>	<i>lupus</i>	<i>EAS</i>	<i>proliferación</i>	<i>NF-κB</i>
<i>homeostasis</i>		<i>ALPS</i>		<i>célula T</i>
	<i>glomerulonefritis</i>	<i>TCR</i>	<i>FADD</i>	<i>gld</i>
<i>ERK</i>		<i>activada</i>		
<i>C-8</i>	<i>memoria</i>	<i>tolerancia</i>	<i>naïve</i>	<i>DN</i>

1. Introducción al sistema inmune

El término inmunidad se identifica con la protección frente a enfermedades, principalmente infecciosas. Sin embargo, existen elementos no infecciosos que también son capaces de originar una respuesta inmune. El sistema inmunológico juega un doble papel en el mantenimiento de la integridad del organismo, puesto que además de defendernos frente a las agresiones de agentes externos o internos, puede originar determinadas enfermedades en algunas situaciones anómalas.

Existen múltiples agentes patógenos que pueden ser perjudiciales para la salud de un individuo. Una importante cualidad del sistema inmune es su capacidad de distinguir entre componentes extraños potencialmente nocivos y componentes del propio organismo. Para llevar a cabo una respuesta defensiva efectiva frente al agente invasor, el sistema inmunológico actúa mediante dos líneas de defensa diferentes que cooperan y se coordinan entre sí: el sistema inmunológico innato y adquirido.

1.1. Inmunidad innata

Ante la invasión de un agente extraño en el organismo, la primera línea de actuación está constituida por el **sistema inmune innato**. Desde el primer momento de contacto con el patógeno este sistema lleva a cabo una rápida respuesta defensiva no específica. La inmunidad innata está constituida, en primer lugar, por barreras físicas y químicas que dificultan la entrada de agentes patógenos. Si un organismo infeccioso penetra en el organismo, existen otros mecanismos defensivos como las proteínas de complemento, las citoquinas inflamatorias, así como diversos tipos celulares (dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos, eosinófilos, asesinas naturales o NK) que patrullan el organismo en busca de patógenos. Estas células reconocen al organismo infeccioso mediante receptores de superficie que identifican determinados patrones moleculares que son compartidos por múltiples agentes patógenos.

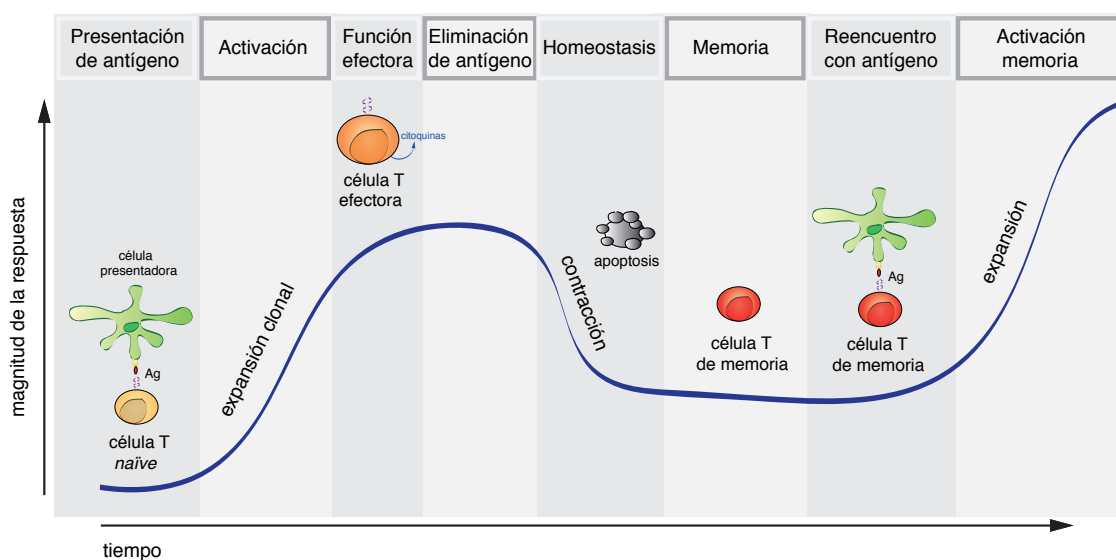
1.2. Inmunidad adquirida

A pesar de que el sistema inmune innato proporciona una efectiva línea de defensa frente a una invasión infecciosa, muchos agentes patógenos han desarrollado estrategias de resistencia frente al mismo y deben ser eliminados mediante la puesta en marcha de respuestas específicas por parte del **sistema inmune adquirido** [1]. Este sistema se identifica con respuestas inmunes especializadas que se adaptan en función del tipo de agente extraño. Esta respuesta defensiva puede llevarse a cabo mediante la acción de las células B o T. Las células B producen anticuerpos en respuesta a agentes extracelulares (inmunidad humoral). Las células T responden a antígenos (en adelante, Ag) extracelulares que han sido previamente fagocitados o a Ag intracelulares que son presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad (en adelante, MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) (inmunidad celular).

Las células B y T poseen una enorme variedad de receptores de superficie, generados mediante re-

combinación somática de determinados segmentos genéticos. Este hecho determina la gran diversidad y especificidad del sistema inmune adquirido. Como se desarrollará más adelante, una de las propiedades más importantes de este sistema es su capacidad para no responder frente a antígenos propios, conocida como auto-tolerancia.

Tras el reconocimiento de un determinado antígeno, los linfocitos se activan. A continuación se produce una acusada proliferación conocida como expansión clonal, que amplifica la función efectora de estas células para poder combatir el antígeno. Una vez eliminado el agente extraño, se produce la fase de contracción, donde los linfocitos previamente activados mueren por apoptosis y el sistema inmune vuelve a su estado basal, o de homeostasis. No obstante, no todos estos linfocitos mueren, pues sobrevive una población de células de memoria que persiste a lo largo del tiempo [2-4]. De este modo, si un mismo antígeno vuelve a ser reconocido por las células del sistema inmune adquirido, las células de memoria desencadenan una respuesta más rápida y efectiva que la primera vez que se detectó este agente [5, 6] (Esquema 1).



Esquema 1. Presentación de un antígeno específico a células T. Durante una respuesta primaria las células T *naïve* reconocen un antígeno específico. Este hecho conduce a la activación y proliferación de estas células para llevar a cabo su función efectora. Una vez eliminado el antígeno, la mayoría de las células T muere por apoptosis durante la fase de contracción, pero sobrevive una población de células T de memoria específica. En una respuesta secundaria ante el mismo antígeno, las células T de memoria responden de manera más rápida y eficaz que durante la primera presentación.

2. Celulas T

2.1. Funciones y tipos de células T

Se puede destacar a dos tipos mayoritarios de células T que se diferencian por la expresión del co-

receptor CD4 o CD8, que se une al MHC clase II o clase I, respectivamente.

Las **células T CD8⁺** se encargan de eliminar a las células que contienen patógenos intracelulares, así como a aquellas células que han sufrido un proceso de transformación cancerígena y presentan antígenos unidos al MHC I.

Las **células T CD4⁺** responden a antígenos que son capturados y presentados a través del MHC II de las células presentadoras de antígeno (en adelante APC, del inglés *Antigen-Presenting Cell*) que pueden ser dendríticas, macrófagos, células B, etc. Tras activarse, estas células llevan a cabo su función efectora mediante la secreción de citoquinas como la interleuquina-2 (en adelante, IL-2), que promueve la proliferación y diferenciación de las propias células T y otras citoquinas que suscitan la activación de las células B o de los macrófagos. Por lo tanto, las células T CD4⁺ desempeñan una función esencial en el organismo, dado que son las mediadoras de la respuesta inmune celular y humoral.

Las células T se pueden clasificar en tres grupos: *naïve*, activadas-efectoras o de memoria (esquema 2). Tras desarrollarse en el timo, las células T *naïve* (CD44^{bajo}) migran hacia los órganos linfoides secundarios (principalmente nódulos linfáticos y bazo) donde podrán reconocer a antígenos específicos. A continuación, se diferenciarán en células T activadas-efectoras (CD44^{alto}), que pueden migrar hacia otros órganos para ejecutar su función efectora. Una vez que el agente extraño ha desaparecido del organismo, permanece una población de células T de memoria específica. Se puede distinguir dos tipos de poblaciones de células T de memoria, que en adelante se definirán como células T de memoria/activadas (CD44^{alto}, CD62L⁺) y células T de memoria (CD44^{alto}, CD62L⁻). La expresión de la L-selectina CD62L permite la extravasación a través de las vénulas endoteliales altas (HEV, del inglés *High Endothelial Venules*), favoreciendo la entrada a los nódulos linfáticos [7].

célula T	marcadores extracelulares
naïve	CD44 ^{bajo}
activada-efectora	CD44 ^{alto}
memoria/activadas	CD44 ^{alto} , CD62L ⁺
memoria	CD44 ^{alto} , CD62L ⁻

Esquema 2. Clasificación de células T. Marcadores de moléculas extracelulares que definen las poblaciones de células T *naïve*, activadas-efectoras, de memoria/activadas y de memoria.

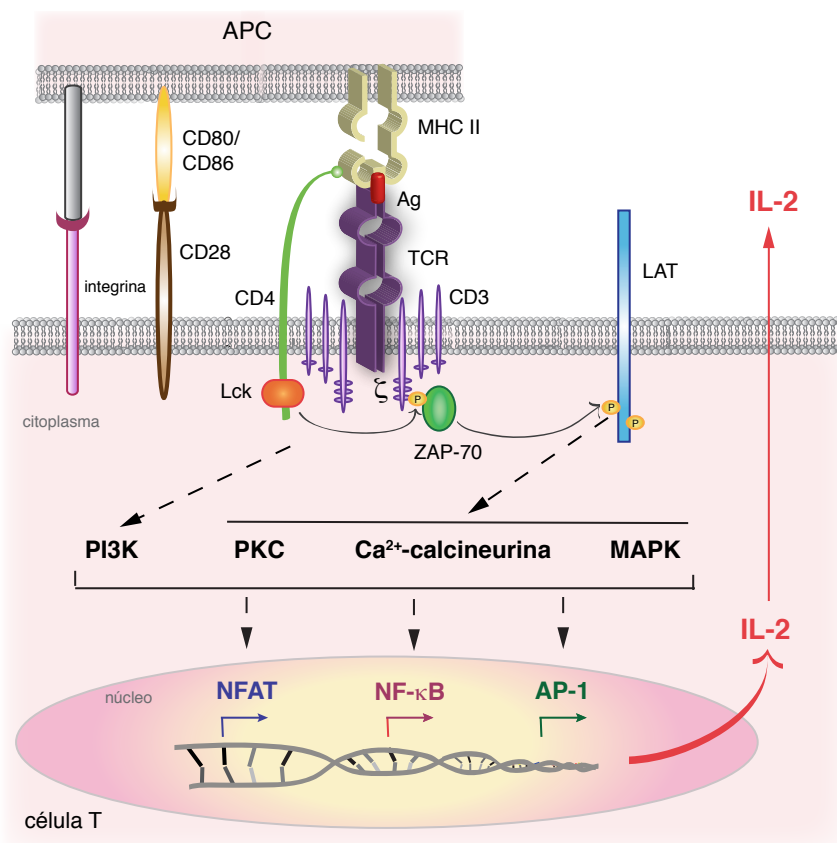
Dependiendo del ambiente inflamatorio y de otras variables presentes durante una respuesta a un

antígeno, las células T CD4⁺ se pueden diferenciar en distintos tipos de células colaboradoras (Th, del inglés *helper T cell*) que se clasifican como Th1, Th2, Th17, Tfh (del inglés, *T follicular helper*) o células T reguladoras (en adelante, Treg). Las células Th17 favorecen la respuesta inflamatoria, mientras que las Treg limitan la respuesta inmune. Los diferentes tipos de células Th pueden distinguirse por las citoquinas que producen, así como por sus funciones en el sistema inmune [8].

2.2. Mecanismos moleculares que subyacen a la activación del TCR

Tras el reconocimiento de un péptido por parte de una célula T, se induce una respuesta que conduce a la activación y proliferación de las mismas. Para que se lleve a cabo esta respuesta se deben cumplir, al menos, tres requisitos básicos: i) un reconocimiento específico del antígeno, ii) una adhesión estable entre la célula T y la célula que presenta el Ag y iii) una transducción de señales desde la superficie de las células T hasta el núcleo que culmine con la producción de moléculas responsables de la activación de estas células.

Una vez que el receptor de la célula T (en adelante TCR, del inglés *T Cell Receptor*) reconoce a un péptido específico presentado por las APC, se inicia una transducción de señales mediante la acción de diferentes moléculas situadas en la membrana de las células T. Entre estas moléculas se encuentran los co-receptores CD4 y CD8, las moléculas de adhesión (integrinas, etc), o proteínas como CD28, que se une a las moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 (en adelante, B7) situadas en la superficie de las APC para favorecer la transducción de señales a través del TCR [9-11]. Asimismo, en la membrana de las células T se puede encontrar otras proteínas accesorias como CD3 y las cadenas ζ , que poseen unos motivos ITAM (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). Tras el reconocimiento de un antígeno, los residuos de tirosina de los motivos ITAM son fosforilados por las quinasas de la familia Src. Dentro de esta familia de quinasas podemos encontrar a Lck, que se asocia con CD4 o CD8, y a Fyn, que se une a CD3 [12]. En este momento, la quinasa ZAP-70 es reclutada a las cadenas ζ y, tras activarse, fosforila a residuos de tirosina de otras moléculas adaptadoras como LAT (del inglés, *Linker for Activation of T cells*), impulsando así determinadas rutas de transducción de señales que conllevan la activación de las células T [13]. Entre estas rutas de señalización se puede destacar a las MAP quinasas (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase*), la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), la proteína quinasa C θ (PKC θ) o la ruta del calcio²⁺-calcineurina [14-18]. Todas estas rutas conducen a la activación de los factores de transcripción NFAT (del inglés, *Nuclear Factor of Activated T cells*), AP-1 (del inglés, *Activator Protein-1*) o NF- κ B (del inglés, *Nuclear Factor-kappa B*), que son necesarios para llevar a cabo las funciones propias de las células T activadas. Estos factores de transcripción inducen la producción de varias citoquinas, entre las que cabe destacar a IL-2 [15], que es el principal factor de crecimiento autocrino de las células T [19] (esquema 3).

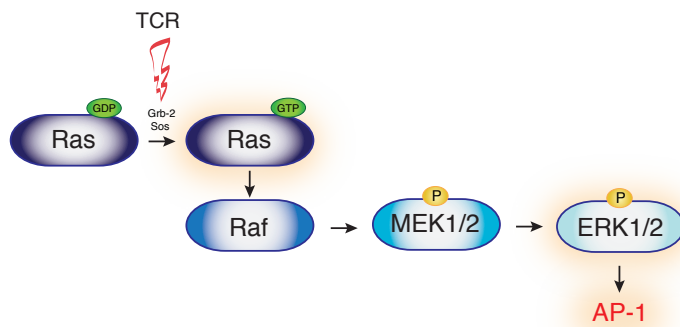


Esquema 3. Mecanismos moleculares activados tras la estimulación del TCR. Tras el reconocimiento de un antígeno presentado a través de un MHC II de una APC, Lck fosforila a los motivos ITAM de las cadenas ζ . Este hecho promueve la unión y activación de ZAP-70, que a su vez fosforila a LAT. Desde aquí se ponen en marcha distintas rutas de señalización (PKC, Ca²⁺-calcineurina, MAPK), que junto con la ruta de la PI3K culminan en la activación de los factores de transcripción NFAT, NF- κ B y AP-1. Como consecuencia, se estimula la producción de IL-2.

Entre los elementos que son activados como consecuencia de la estimulación del TCR, cabe destacar por su importante papel en la activación y proliferación de las células T a las MAP quinasas ERK-1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) y al factor de transcripción nuclear NF- κ B [20, 21].

2.2.1. Ruta de las MAP quinasas

La proteína G Ras forma parte de la ruta que conlleva la activación de ERK-1/2 y está unida a GDP en su forma inactiva. Tras la activación del TCR, este GDP es reemplazado por GTP mediante la acción del factor de intercambio de nucleótidos Sos, que es reclutado por Grb-2. Como consecuencia, Ras sufre un cambio conformacional que le permite activar a otras enzimas quinasas como Raf, que fosforila a MEK-1/2, las cuales a su vez fosforilan y activan a ERK-1/2. Este hecho facilita la translocación de ERK-1/2 al núcleo, donde este dímero fosforila a Elk, que a su vez estimula la transcripción de Fos, un componente del factor de transcripción AP-1 [20] (esquema 4).

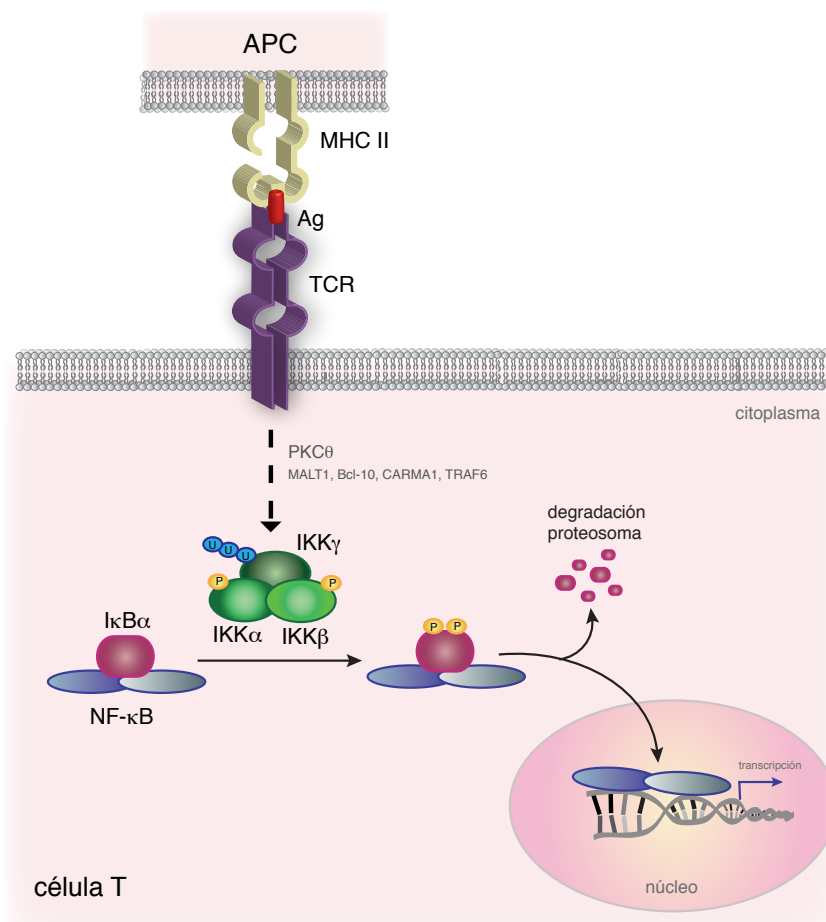


Esquema 4. Cascada de activación de las MAP-quinasa ERK1/2. Tras la estimulación del TCR, Ras se activa y pone en marcha una cascada de quinasas que culmina en la activación de ERK1/2. Esta quinasa a su vez estimula al factor de transcripción AP-1.

En paralelo a la activación de Ras, tras la estimulación del TCR también se pueden activar las quinasas N-terminales c-Jun (JNK) o p38 [22].

2.2.2. Ruta de NF- κ B

NF- κ B es un factor de transcripción esencial para la inducción de genes involucrados en la proliferación y supervivencia de las células T [21, 23]. Este factor de transcripción está formado por homodímeros o heterodímeros, siendo la forma mayoritaria p65-p50. En células en estado basal, NF- κ B se encuentra formando un complejo con el inhibidor alpha de NF- κ B (en adelante, I κ B α), que mantiene secuestrado a este dímero en el citoplasma al ocultar sus secuencias de localización nuclear [21].



Esquema 5. Ruta de señalización de NF- κ B. La estimulación del TCR en respuesta a un antígeno pone en marcha una serie de acontecimientos moleculares que culminan con la activación del complejo IKK. En este contexto, el complejo IKK fosforila a I κ B α que, como consecuencia, será ubiquitinado y degradado en el proteosoma. Este hecho permite la liberación de NF- κ B y su translocación al núcleo, donde va a ejercer su función como factor de transcripción de determinados genes.

Cuando se produce la estimulación del TCR, la PKC θ se desplaza hacia la región de la sinapsis inmunológica, donde forma un complejo de activación con MALT1, Bcl-10, CARMA-1 y TRAF6. Entre los integrantes de este conjunto de moléculas también se incluye el complejo de quinasas del inhibidor I κ B α (en adelante, complejo IKK), que está formado por dos subunidades catalíticas (IKK α , IKK β) y una reguladora (IKK γ o NEMO) [24, 25]. En este contexto, IKK γ es ubiquitinada e IKK α /IKK β son fosforiladas [26]. En este momento, el complejo IKK se activa y fosforila a I κ B α en sus residuos de tirosina, lo que conduce a su posterior ubiquitinación y degradación en el proteosoma. Como consecuencia, NF- κ B es liberado y puede traslocarse al núcleo, donde ejercerá sus funciones como factor de transcripción (esquema 5).

3. Tolerancia y autoinmunidad

En el organismo se genera una gran diversidad de linfocitos con diferentes TCR. Los receptores de los linfocitos T se generan a partir de la misma secuencia de genes mediante mecanismos moleculares de recombinación que se producen al azar. Por lo tanto, no es extraño que dentro de este gran repertorio se produzcan linfocitos T capaces de reconocer antígenos propios. Una extraordinaria característica que ha desarrollado el sistema inmune es su capacidad para distinguir entre componentes propios y ajenos al propio individuo. De esta manera, se evitan reacciones a antígenos propios no deseadas que podrían poner en peligro la integridad del organismo. Así, las células T pueden distinguir entre antígenos procedentes de agentes patógenos y antígenos propios gracias a las moléculas co-estimuladoras (CD80-CD86) de las APC, cuyos niveles aumentan en respuesta a productos microbianos. En la mayoría de los casos, la correcta activación de las células T tras la estimulación del TCR requiere la interacción de CD28 con CD80/CD86.

En algunas ocasiones los linfocitos pueden reconocer antígenos propios, pero deben ser eliminados o inactivados para mantener la homeostasis inmunológica. La ausencia de respuesta inmunológica frente a antígenos es conocida como **tolerancia**.

Los linfocitos capaces de responder a un antígeno propio pueden causar un importante daño en el organismo. Por esta razón existen múltiples mecanismos para mantener bajo control a los linfocitos auto-reactivos. El fenómeno de tolerancia se produce a dos niveles en el organismo, en una primera barrera los linfocitos T potencialmente auto-reactivos se eliminan durante el proceso de maduración en el timo (tolerancia central). Las células que pasan este primer control son eliminadas o su activación es controlada posteriormente mediante diferentes estrategias que tienen lugar en tejidos diferentes al timo (tolerancia periférica) [27].

3.1. Tolerancia central

El proceso de selección tímica elimina el repertorio de linfocitos T capaces de reconocer antígenos propios presentados en el timo [28]. La efectividad de la tolerancia central se basa en la correcta sucesión de dos procesos:

- **Selección positiva:** aquellos timocitos cuyo TCR es capaz de reconocer a los complejos formados por el MHC y los auto-antígenos con poca afinidad se estimulan y se diferencian en células T CD4⁺ o CD8⁺, mientras que aquellos que no reconocen este complejo no sobreviven.

- **Selección negativa:** los timocitos inmaduros con una elevada afinidad por antígenos propios presentados en el timo se eliminan por apoptosis al ser potencialmente auto-reactivos.

Por lo tanto, los linfocitos T maduros que abandonan el timo son tolerantes ante la mayoría de auto-antígenos. Cualquier fallo en el proceso de tolerancia central conlleva la presencia de linfocitos T auto-reactivos en la periferia.

3.2. Tolerancia periférica

La tolerancia periférica consiste en la ausencia de respuesta inmunológica ante antígenos propios que son presentados en tejidos fuera del timo [29]. Dentro de los diferentes mecanismos de tolerancia periférica existen varias estrategias para evitar la activación de las células T auto-reactivas o favorecer su eliminación (ver esquema 6, explicado abajo).

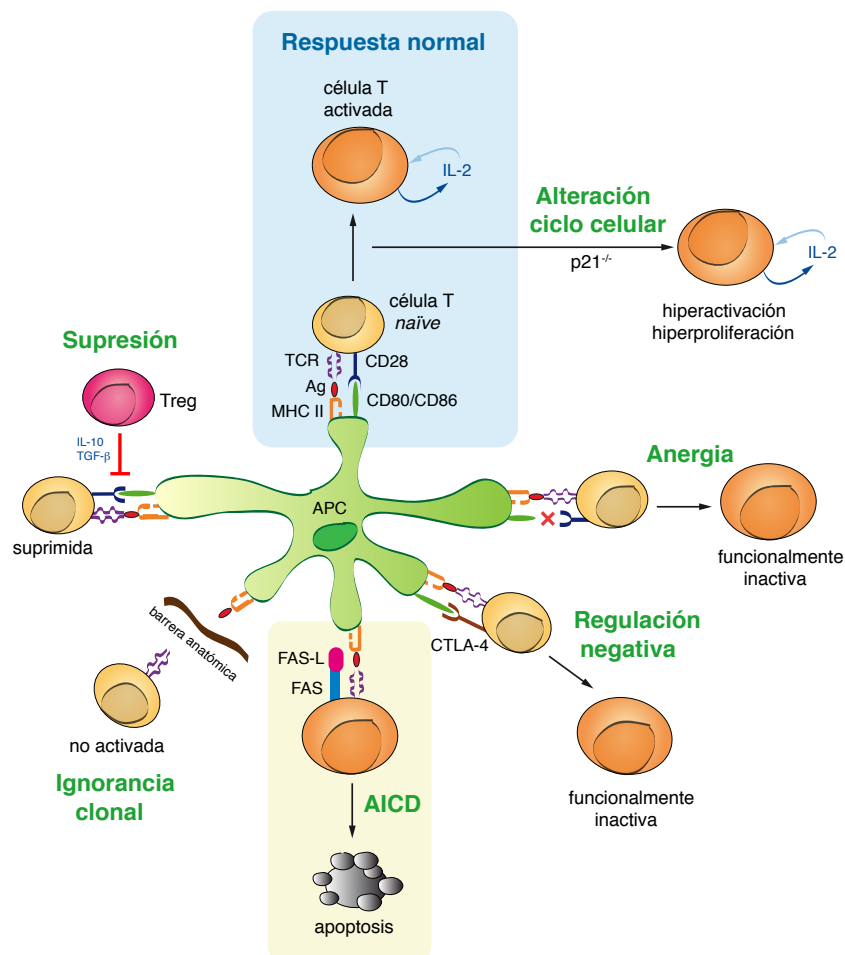
Una correcta estimulación de una célula T *in vivo* requiere un ambiente inflamatorio que aumente los niveles de las moléculas B7, permitiendo una interacción apropiada entre las APC y las células T. La tolerancia a un antígeno tiene lugar cuando el ambiente co-estimulador o la respuesta del sistema inmune innato son incompletos durante su presentación. En este contexto se puede englobar a la presentación de auto-antígenos, donde las APC se encuentran en estado de reposo (niveles bajos de B7) y no ha habido activación del sistema inmune innato. Este caso es conocido como **anergia clonal**, donde las células T son funcionalmente incapaces de responder ante la presentación de un antígeno debido a la señalización inapropiada del TCR [30].

Se han descrito situaciones donde la ausencia de determinadas moléculas conlleva la pérdida de tolerancia. Existen moléculas inhibitoras que producen una **regulación negativa** de la señalización del TCR. En este caso se puede destacar a CTLA-4 (del inglés, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*) [31], que impide la unión de CD28 a B7 o puede reclutar a una fosfatasa que bloquea la fosforilación de las cadenas ζ del TCR. Asimismo, el inhibidor PD-1 (del inglés, *Programmed cell Death-1*) [32] se une a sus ligandos PD-L1 y PD-L2 y atrae a determinadas fosfatasas hacia la región del TCR, atenuando de este modo su señali-

zación. Estas moléculas también se han relacionado con la inducción de anergia clonal. El balance entre estas señalizaciones negativas y la co-estimulación determina la naturaleza de la respuesta de la célula T. La pérdida de CTLA-4 o PD-1 conduce al desarrollo de autoinmunidad [32, 85, 116, 172, 173]. Por otro lado, se ha comprobado que defectos en varios reguladores del **ciclo celular** como E2F2 [33], Gadd45 α [34], Gadd45 β y Gadd45 γ [35] y p21 [36-38] están asociados con una pérdida de tolerancia (ver apartado 5.2. de la introducción).

Existe una población de células T CD4⁺ conocidas como **células T reguladoras** (CD25⁺, Foxp3⁺), que producen citoquinas inmunosupresoras (IL-10, TGF- β) que limitan la respuesta de las células T y APC [39]. Su ausencia conlleva la pérdida de tolerancia, tanto en ratones como en humanos [40].

Otro mecanismo de tolerancia periférica es la **ignorancia clonal**, donde el antígeno se encuentra en una zona inaccesible o su cantidad es insuficiente para desencadenar una respuesta en las células T.



Esquema 6. Mecanismos de tolerancia periférica. La ausencia de respuesta inmunológica frente a auto-antígenos se puede llevar a cabo mediante diferentes estrategias: anergia, regulación negativa (CTLA-4, PD-1), muerte celular inducida por activación (AICD), ignorancia clonal, supresión por las células T reguladoras (Treg). Por otro lado, la alteración de determinadas moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular (p21) conlleva la hiperactivación de las células T, favoreciendo la pérdida de tolerancia.

Por otro lado, existen otras estrategias donde es la propia activación de las células T auto-reactivas la que induce mecanismos reguladores. Este es el caso de la **muerte celular inducida por activación** (en adelante AICD, del inglés *Activation Induced Cell Death*), donde los linfocitos que son estimulados de manera repetida mueren por apoptosis vía FAS [41](ver ruta en el apartado 3.2.1. y esquema 7 de la introducción). La mayoría de las evidencias que involucran a la ruta de FAS en el proceso de AICD proceden de estudios realizados *in vitro*. En un ensayo clásico de AICD *in vitro*, después de estimular el TCR se añade IL-2 y, tras un período de expansión, se vuelve a estimular a estas mismas células. Como consecuencia, se induce una apoptosis por activación en el 90 % de la población efectora, y el 10 % restante de linfocitos supervivientes presenta un fenotipo de células de memoria (CD44^{alto}) [42, 43, 44]. Sin embargo, el papel de FAS en la tolerancia periférica *in vivo* no está definido [45]. Para el estudio de la inducción de apoptosis *in vivo* se han utilizado modelos de inmunización con superantígenos o sistemas donde la población de células T específica para un antígeno representaba una elevada fracción respecto al total de células T [46-49]. De este modo, la relevancia fisiológica y la validez representativa de estos estudios no está definida.

Como consecuencia de la pérdida de tolerancia contra antígenos propios, se genera una respuesta inmune que desemboca en daños en los tejidos del organismo característicos de las enfermedades autoinmunes (ver apartado 4.3. de la introducción).

3.2.1. FAS y la ruta apoptótica

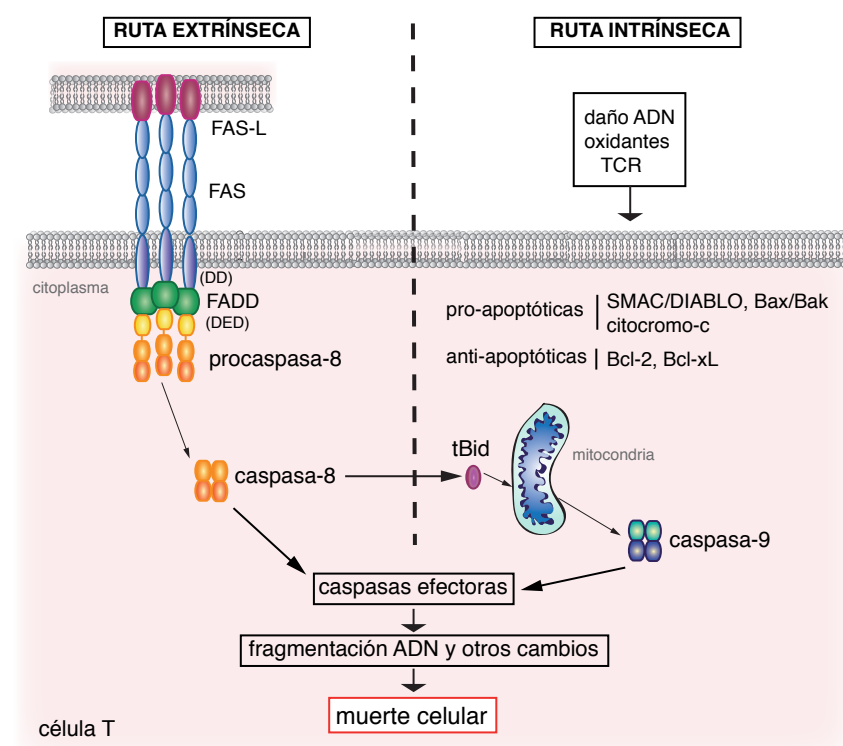
FAS (conocido también como CD95, o APO-1) es un receptor transmembrana de la familia TNF (del inglés, *Tumor Necrosis Factor*) formado por 3 dominios extracelulares que, tras interaccionar con FAS-L, se une a la molécula adaptadora FADD (del inglés, *FAS Associated Death Domain*) a través de su dominio intracelular de muerte (DD, del inglés *Death Domain*) [50]. En este momento se desencadena una cascada de activación de caspasas, que son aspartato-cisteín proteasas sintetizadas como pro-enzimas con escasa actividad enzimática (pro-caspasas), cuya activación depende de su propio procesamiento proteolítico [51]. Esta cascada comienza con el reclutamiento y posterior activación de la procaspasa-8 a través del dominio efector de muerte (DED, del inglés *Death Effector Domain*) de FADD. Las procaspasas están formadas por un prodominio, una subunidad enzimática grande y otra subunidad enzimática pequeña. Tras su interacción con FADD, se produce un cambio conformacional en la pro-caspasa 8 que conduce a su auto-procesamiento, liberándose el prodominio. En este momento las dos subunidades enzimáticas se ensamblan formando heterotetrámeros de caspasa-8 (en adelante, C-8) activa. El complejo formado por todas estas moléculas se conoce como DISC (del inglés, *Death-Inducing Signaling Complex*). Tras el ensamblaje de múltiples DISC se produce su internalización. Como consecuencia, se genera un aumento local en la concentración de C-8 que favorece su auto-procesamiento [52].

Esta ruta “extrínseca” iniciada tras la interacción de FAS con FAS-L, se puede amplificar mediante su

conexión con la ruta “intrínseca” de muerte a través de la C-8. Esta caspasa puede generar una forma truncada de Bid (t-Bid), que juega un importante papel en la ruta intrínseca de muerte. Además de Bid, existen otras proteínas pro-apoptóticas (SMAC/DIABLO, Bax/Bak, citocromo-c) y anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL) en la ruta de muerte intrínseca, que culmina con la activación de la caspasa-9 [53, 54]. Asimismo, la ruta intrínseca se puede activar de forma independiente a la ruta de FAS/FAS-L en respuesta a múltiples estímulos. Las caspasas-8 y 9 activan a su vez a otras caspasas efectoras (caspasas 3, 6, 7) que promueven determinados cambios morfológicos en la célula (condensación de la cromatina, contracción del citoplasma, burbujas en la membrana plasmática, etc) y finalmente se produce una rotura del ADN (ácido desoxirribonucleico) en fragmentos de tamaño nucleosomal, que es indicativa de la muerte celular por apoptosis (esquema 7).

Un importante regulador negativo de la ruta de FAS es FLIP (del inglés, *caspase-8 (FLICE)-Like Inhibitor Protein*) [55]. c-FLIP compete con C-8 por la unión a FADD, favoreciendo de este modo una regulación negativa o positiva de la apoptosis, respectivamente.

FAS-L puede encontrarse en forma de homotrímeros anclados a la membrana o en forma soluble, por lo que puede unirse a un receptor FAS de la misma célula o de células vecinas. En contraste con la amplia distribución de FAS en el organismo, FAS-L presenta un patrón de expresión mucho más restringido. La expresión de este ligando se induce fundamentalmente en linfocitos T tras su activación [56, 57] y en algunos tejidos periféricos bajo circunstancias concretas [58]. Por lo tanto, el proceso de AICD se controla fundamentalmente a nivel de la transcripción de FAS-L, cuyos niveles aumentan de manera significativa en células T activadas mediante protocolos de AICD en presencia de IL-2 [43, 59, 60].



Esquema 7. Ruta extrínseca e intrínseca de muerte celular por apoptosis. La cascada de activación de caspasas se produce como consecuencia de la estimulación de FAS vía FAS-L (ruta extrínseca) o mediante señales que activan la ruta mitocondrial de muerte (ruta intrínseca). Las caspasas efectoras producen alteraciones en la célula que desencadenan en la muerte de la misma.

4. Patologías autoinmunes

4.1. Ratones *lpr*, enfermedad autoinmune tipo lupus

Cuando fallan los mecanismos de tolerancia los linfocitos auto-reactivos responden ante antígenos propios, lo que conduce a su activación, proliferación y diferenciación en células efectoras. Estos linfocitos auto-reactivos generan daños en los tejidos que caracterizan a las enfermedades autoinmunes.

Existen diferentes estrategias para estudiar el fenómeno de tolerancia *in vivo*. Entre estas aproximaciones cabe destacar la administración de antígenos externos, el uso de animales con TCR transgénicos (en adelante, TCRtg) específicos para un antígeno, así como la sobre-expresión o eliminación de determinados genes en modelos murinos. A pesar de que las enfermedades autoinmunes suelen estar causadas por alteraciones en múltiples genes, el estudio de estos últimos modelos murinos ha aportado información muy útil para mejorar el conocimiento de los mecanismos de auto-tolerancia.

Existen varios tipos de ratones que desarrollan enfermedades autoinmunes similares a las identificadas en humanos. Entre estos modelos podemos destacar un tipo de ratones conocidos como *lpr* (del inglés, *lymphoproliferative*), que tienen una profunda deficiencia en la expresión de FAS y, consecuentemente, una resistencia a la apoptosis. Estos ratones tienen una mutación autosómica recesiva que se produce por la inserción de un retrotransposón dentro de un intrón del gen de *fas* [61]. Los ratones *lpr* presentan un fenotipo que se caracteriza por una notable linfadenopatía, esplenomegalia, una elevada presencia de auto-anticuerpos, acumulación de inmunocomplejos (anticuerpos + antígenos) en el riñón, hipergamaglobulemia, glomerulonefritis, artritis, y una acumulación de una población aberrante de células T doble negativas ($\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{B220}^+ \text{CD4}^- \text{CD8}^-$) (en adelante, DN) y células T de memoria [62]. Los inmunocomplejos tienden a acumularse en los riñones debido a su carga catiónica y activan al sistema de complemento desencadenando una reacción inflamatoria [63, 64]. Estas alteraciones renales provocan un deterioro severo de la función renal que puede conducir a la muerte prematura de los ratones deficientes en FAS con el fondo genético MRL-*mp*, que acentúa la gravedad del fenotipo autoinmune respecto a otros fondos como el C57BL/6 [65] (esquema 8).

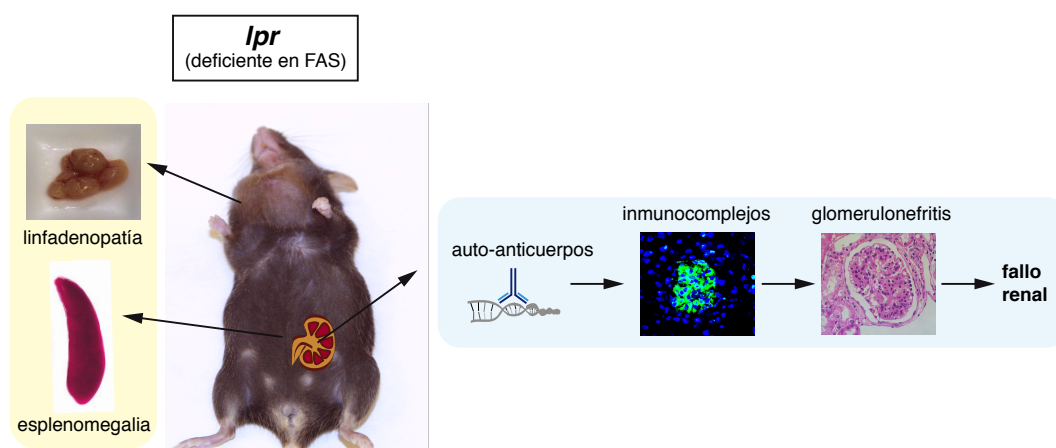
Se ha descrito que los ratones deficientes en FAS no muestran ninguna alteración significativa en la tolerancia central de las células T [46]. Por lo tanto, su fenotipo se debe a una alteración en el proceso de tolerancia periférica.

Debido a la ausencia de FAS, las células T de los ratones *lpr* presentan una clara resistencia a la muerte celular inducida por activación *in vitro* [41]. Se ha atribuido el origen de la autoinmunidad de los ratones *lpr* a su defecto en AICD, que podría conducir a una acumulación de células T auto-reactivas, que a su vez ayudarían a producir auto-anticuerpos a las células B auto-reactivas [62]. Sin embargo, no se ha de-

finido la función de FAS en el proceso de AICD *in vivo* [45]. Por otro lado, existen diversos estudios que cuestionan el hecho de que el fenotipo de los ratones *lpr* pueda ser explicado meramente por su defecto en apoptosis (ver apartado 4.2. de la introducción).

Cabe destacar que en los ratones deficientes en FAS las células T DN, CD4⁺ y CD8⁺ muestran un perfil hiperproliferativo *in vivo* [66, 67]. Actualmente se desconoce el origen de esta hiperproliferación, así como su influencia en el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

Los ratones *lpr* presentan un fenotipo con manifestaciones muy similares a las detectadas en pacientes con determinadas enfermedades autoinmunes (ver apartado 4.3. de la introducción).



Esquema 8: Fenotipo de los ratones *lpr*. Estos ratones se caracterizan por un notable aumento en el tamaño de los órganos linfoides secundarios y altos niveles de auto-anticuerpos (por ejemplo, anti-ADN) que forman inmunocomplejos (anticuerpos + antígenos) en el riñón. Finalmente, se desarrolla una destacada glomerulonefritis que culmina en un importante fallo renal.

Asimismo, existen otros modelos murinos con alteraciones en FAS o FAS-L que desarrollan un fenotipo similar al encontrado en los ratones *lpr*. Se trata de los ratones *gld* (mutación de FAS-L que impide su correcta interacción con FAS)[68] y los ratones *lpr^{csj}* (mutación en el DD de FAS que impide el reclutamiento de FADD)[69].

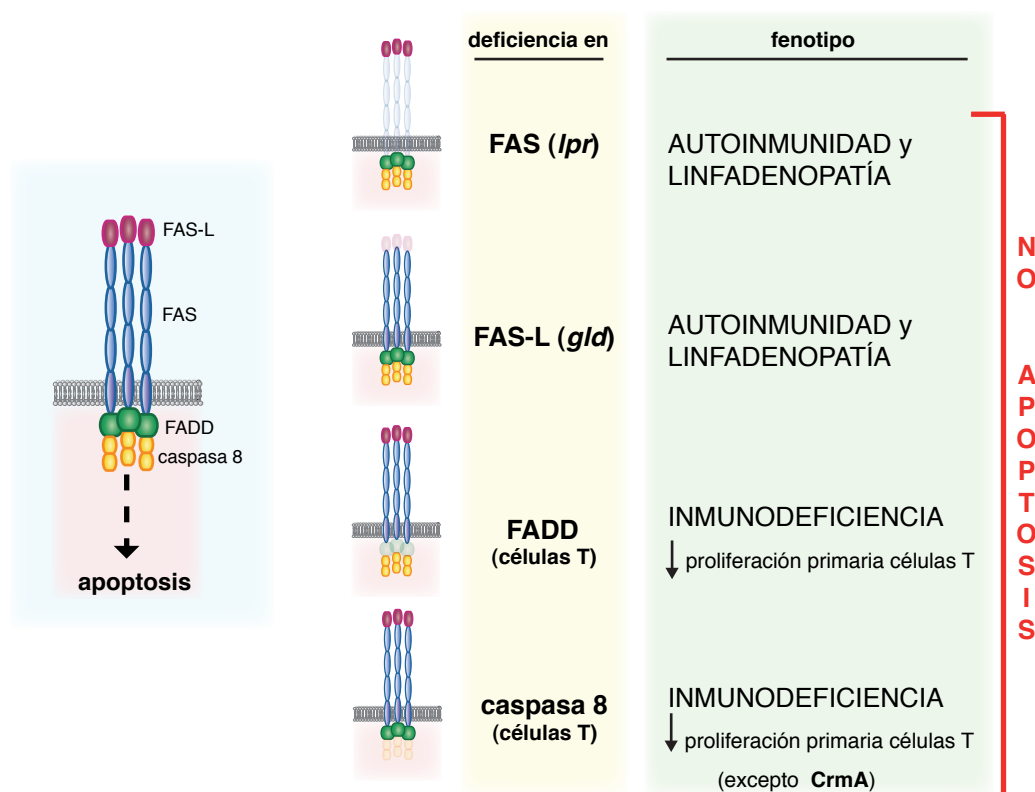
4.2. Los ratones deficientes en FADD y C-8 no explican el fenotipo de los ratones *lpr*

La acumulación de linfocitos auto-reactivos en ratones *lpr* se ha atribuido a su resistencia al proceso de AICD. Sin embargo, los estudios realizados en modelos murinos con alteraciones en la expresión o funcionalidad de otros componentes de la ruta apoptótica iniciada por FAS como FADD o C-8, cuestionan que el defecto en AICD sea la única explicación para el fenotipo de los ratones *lpr*.

Los ratones deficientes en FADD o en C-8 son letales embrionarios [70, 71], por lo que alternatively se han desarrollado diversos modelos experimentales para estudiar el efecto de la ausencia de ambas moléculas en las células T. Algunos de estos modelos se han basado en la sobre-expresión de

un transgén dominante negativo de FADD con alteraciones en el DED en las células T (bajo el promotor *lck*). Otros modelos consisten en la inactivación de C-8 en las células T con el sistema *Cre/LoxP* o en la sobre-expresión en las células T de un inhibidor viral de la forma procesada de C-8, *crmA* [72-74]. Estos ratones deficientes en FADD o C-8 específicamente en las células T, presentan una alteración de la ruta apoptótica en estas células, al igual que los ratones *lpr* y *gld*. Sorprendentemente, en contraste con los ratones deficientes en FAS o FAS-L, los modelos murinos deficientes en FADD o C-8 en las células T presentan un fenotipo de inmunodeficiencia generalizada (bajo número de linfocitos T, respuestas inmunitológicas defectuosas), carente de rasgos tales como adenopatía, acumulación de células T DN o células de memoria, etc [72, 74-76]. Asimismo, estos ratones deficientes en FADD o C-8 presentan un importante defecto proliferativo en las células T tras su activación *in vitro*, que podría explicar su fenotipo [77-81]. Por otro lado, se ha descrito que las células T de los ratones transgénicos para el inhibidor *crmA* no presentan defectos en la proliferación [73].

En su conjunto, todos estos datos plantean una relación entre los componentes de la ruta de señalización apoptótica y los mecanismos de control de la activación y proliferación de las células T (esquema 9).



Esquema 9. Consecuencias inmunológicas de los defectos en FAS, FAS-L, FADD o caspasa-8.

Este hecho cuestiona la hipótesis de que el fenotipo de los ratones *lpr* puede ser explicado únicamente mediante un defecto en AICD.

4.3. Enfermedades autoinmunes humanas: ALPS y lupus

En determinadas situaciones anómalas los linfocitos T auto-reactivos pueden escapar a los controles establecidos por los mecanismos de la tolerancia, generándose una reacción inmune contra antígenos propios que puede causar graves daños en los tejidos del organismo. Dentro de este escenario se puede englobar a las enfermedades autoinmunes, tales como el lupus eritematoso sistémico (en adelante, LES) [82], o el síndrome autoinmune linfoproliferativo (en adelante ALPS, del inglés *Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome*) [83]. Los principales factores que contribuyen al desarrollo de enfermedades autoinmunes son la susceptibilidad genética de cada individuo y las posibles influencias ambientales [84].

El **LES** es una enfermedad que se produce normalmente por la alteración de varios genes y afecta en su mayoría a mujeres, produciendo daños en sus órganos y tejidos vitales. Se trata de una enfermedad con manifestaciones clínicas muy diversas tales como sarpullidos en la piel, pleuritis, pericarditis, alteraciones neurológicas, anemia, anticuerpos anti-ADN y anti-nucleares [82]. Los daños producidos en los tejidos se deben, en parte, a la acumulación de inmunocomplejos en el riñón que provocan una reacción inflamatoria [63, 64]. Las células T auto-reactivas de pacientes con LES invaden tejidos como la piel y los riñones y muestran un perfil hiperproliferativo *in vivo* [85], así como un aumento en la señalización que tiene lugar tras la activación del TCR [86, 87]. Asimismo, estos pacientes presentan un destacado aumento en la población de células T DN, cuyos niveles son muy bajos en individuos sanos [63]. Estas células T DN muestran una producción elevada de IL-17 (interleuquina-17), una citoquina pro-inflamatoria que presenta un importante papel en el desarrollo de la patogénesis del riñón [88]. Un tratamiento común en pacientes con LES suele ser el uso de medicinas anti-inflamatorias, tales como los corticosteroides [82].

Los pacientes con **ALPS** también muestran un fenotipo similar al encontrado en los ratones *lpr* [89], debido a mutaciones en el gen que codifica para FAS o en genes responsables de la expresión de otras moléculas involucradas en la ruta apoptótica (FAS-L, caspasa-10)[83, 90]. Se trata de una enfermedad autoinmune donde un solo gen involucrado en la cascada apoptótica es responsable de su desarrollo. Esta patología debuta en la infancia y se caracteriza por la aparición de linfadenopatía, esplenomegalia, una marcada linfoproliferación, una expansión aberrante de células T DN, aumento de auto-anticuerpos en sangre y anemia hemolítica [83, 90].

5. Ciclo celular y tolerancia periférica

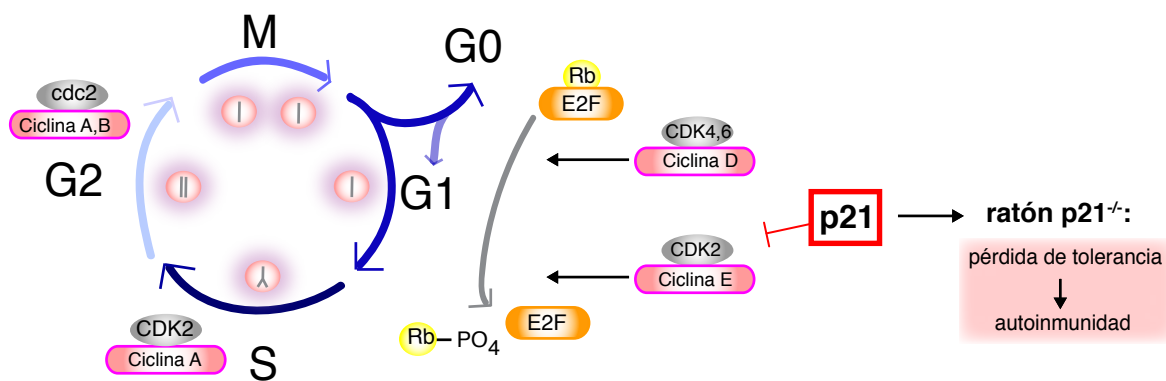
5.1. El ciclo celular

La homeostasis del sistema inmunológico se alcanza mediante un balance entre los procesos de muerte, activación y proliferación. Como se ha descrito anteriormente, se han detectado importantes alteracio-

nes en la proliferación de las células T de pacientes con enfermedades autoinmunes tales como el LES y el ALPS (ver apartado 4.3. de la introducción) y de ratones *lpr* (ver apartado 4.1. de la introducción). Sin embargo, se desconoce la contribución de la hiperproliferación de las células T al fenotipo de estos pacientes y de los ratones deficientes en FAS.

El complejo proceso de división celular forma parte del ciclo celular y se encuentra muy regulado a diferentes niveles en todos los tipos celulares. En general, se puede dividir el ciclo celular en cuatro fases que tienen lugar después de estimular a las células y abandonar la fase quiescente G0: G1 y G2 (preparación para las siguientes fases), S (síntesis, replicación del ADN), y M (mitosis, separación del material genético). El progreso a través de las diferentes fases del ciclo celular es controlado por las proteínas ciclinas, que forman unos complejos con las quinasas dependientes de ciclinas (en adelante, CDK) [91]. Una molécula clave en el ciclo celular es el retinoblastoma (Rb). La fosforilación y activación del Rb por los complejos de ciclina/CDK provoca la liberación de la familia de receptores de transcripción E2F, permitiendo su translocación al núcleo y la entrada en la fase de síntesis del ciclo celular [92] (esquema 10).

La actividad de los complejos ciclina/CDK es reprimida por dos familias de inhibidores de CDK: INK4 (p15, p16, p18 y p19) que inhiben a CDK4 y CDK6 y la familia Cip/kip (p21, p27 y p57), que inhiben a las CDK implicadas en la transición G1/S (esquema 10).



Esquema 10. Ciclo celular en eucariotas. El ciclo celular se divide en cuatro fases: “G1” y “G2” son fases de crecimiento y preparación para las siguientes fases, “S” o fase de síntesis y “M” o fase de mitosis. Los complejos de ciclinas/CDK controlan la transición entre las distintas fases y su actividad es reprimida por varios inhibidores, entre los que cabe destacar a p21.

5.2. p21 y su implicación en la tolerancia periférica

La molécula p21 tiene un conocido papel en la inducción de la parada del ciclo celular tras la activación de p53 [93]. Se ha descrito en nuestro laboratorio un novedoso papel para p21 relacionado con la pérdida de tolerancia periférica [36, 37]. En estos trabajos, los ratones p21^{waf/cip1-/-} (en adelante, p21^{-/-}) de género femenino en fondo mixto C57BL/6 X Sv/129 presentan un fenotipo autoinmune con algunas característi-

cas comunes a las encontradas en los ratones *lpr*. Las hembras $p21^{-/-}$ desarrollan linfadenopatía, esplenomegalia, acumulación de células T de memoria, glomerulonefritis y altos títulos de auto-anticuerpos en sangre que, en su conjunto, aumentan la tasa de mortalidad de estos ratones [36]. El fenotipo de los ratones $p21^{-/-}$ está ligado a graves alteraciones en el control de la homeostasis proliferativa de las células T de memoria/efectoras y a una hiperactivación de los macrófagos [36-38]. Sin embargo, la ausencia de $p21$ no afecta a la proliferación de las células T *naïve* [37]. En este modelo murino existe una relación entre la hiperactivación e hiperproliferación de las células T y la aparición de autoinmunidad.

Existen otros trabajos que relacionan el control del ciclo celular con el desarrollo de autoinmunidad. Se ha comprobado que defectos en otros reguladores del ciclo celular como E2F2 [33], Gadd45 α [34], Gadd45 β y Gadd45 γ [35] están asociados con el desarrollo de un fenotipo autoinmune. Asimismo, se ha descrito que $p27$ está involucrado en la tolerancia periférica y en la proliferación primaria de células T bajo determinadas condiciones *in vitro* e *in vivo* [94-97].

En todos estos modelos murinos con alteraciones en moléculas involucradas en el ciclo celular, el desarrollo de autoinmunidad está relacionado con un menor umbral de activación y una hiperproliferación de las células T [98]. Por lo tanto, estos trabajos sugieren que la regulación de la activación y la proliferación de las células T tiene un papel fundamental para el establecimiento de tolerancia periférica.

Se ha explicado anteriormente que el fenotipo similar al lupus de los ratones *lpr* no puede ser explicado por un mero defecto en AICD (apartado 4.2. de la introducción). Por otro lado, la hiperproliferación *in vivo* detectada en las células T CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ y DN de estos ratones [66, 67] podría deberse a un papel desconocido de FAS en el control de la proliferación de estas células. Por lo tanto, al igual que $p21$, FAS también podría tener una función como regulador negativo de la proliferación de las células T, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis inmunológica.

OBJETIVOS

**“El experimentador que no sabe lo que está buscando
no comprenderá lo que encuentra”**

Claude Bernard. Fisiólogo francés (1813-1878).

estimulación repetida

tolerancia hiperproliferación

lpr

autoinmunidad FAS

activación

citoquinas

péptidos baja afinidad

p21

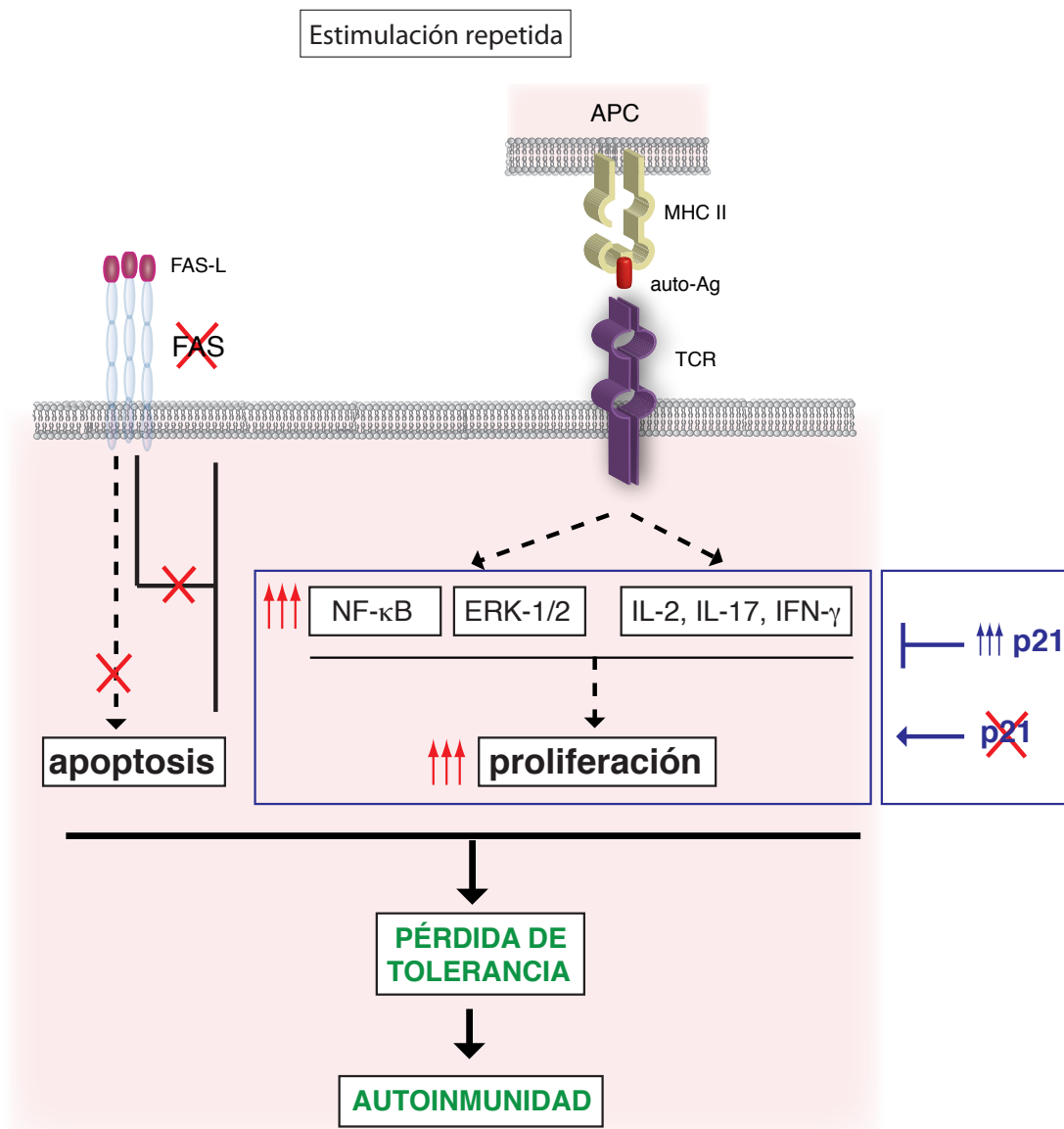
Para mantener la homeostasis del sistema inmune debe haber un balance entre los procesos de activación, proliferación y muerte de las células T. Si se produce una alteración en estos procesos y se rompe la auto-tolerancia, o ausencia de respuesta frente a antígenos propios, pueden desarrollarse enfermedades autoinmunes que atentan contra la integridad del organismo. Este es el caso de los ratones deficientes en FAS (*lpr*), que presentan un fenotipo autoinmune parecido al de los pacientes con ALPS o lupus, asociado a graves alteraciones en la función renal y a una pronunciada linfadenopatía. Tradicionalmente, se ha atribuido el fenotipo de los ratones *lpr* a su defecto en la apoptosis inducida por activación (AICD) [46]. A pesar de los múltiples estudios realizados con los ratones *lpr*, se desconoce el origen de su enfermedad autoinmune y de su linfadenopatía. Los defectos en apoptosis detectados en estudios realizados *in vitro* con células T *lpr* no justifican el fenotipo de estos ratones, puesto que no se ha definido la función de FAS en la inducción de muerte *in vivo*. Además, la ausencia de otras moléculas involucradas en la ruta apoptótica, como FADD o C-8, no conducen al desarrollo de un fenotipo autoinmune [72-76]. Por otro lado, se ha descrito que las células T *lpr* hiperproliferan *in vivo* [66, 67] y que los pacientes de ALPS y lupus muestran una elevada proliferación de las células T [83, 85, 99, 100]. Sin embargo, se desconoce el origen de esta hiperproliferación, así como su relevancia en el desarrollo de las manifestaciones autoinmunes. Por consiguiente, uno de los principales objetivos de esta Tesis es estudiar el papel que, más allá de la apoptosis, podía tener FAS en el control de la activación/proliferación de las células T tras la estimulación del TCR.

Se ha descrito que p21 es un importante inmunosupresor que actúa como regulador negativo de la proliferación de las células T de memoria/activadas, sin afectar a las células T *naïve* [36, 37]. Por lo tanto, se generaron ratones *lpr-p21*^{tg} y *lpr-p21*^{-/-} para analizar la relevancia fisiológica de la hiperproliferación de las células T *lpr* de memoria/activadas en el desarrollo del fenotipo autoinmune de los ratones deficientes en FAS.

Resumen de objetivos (esquema 9):

- 1 Comprobar si FAS ejerce un control en la proliferación de las células T durante una re-estimulación, de manera independiente a su papel en apoptosis.
- 2 Estudiar la relación entre la hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr* de memoria durante una estimulación repetida y su estado de activación, mediante el análisis de NF-κB, ERK-1/2 y varias citoquinas pro-inflamatorias.
- 3 Caracterizar la respuesta de las células T CD4⁺ *lpr* de memoria durante una estimulación reiterada con antígenos de baja afinidad para el TCR *in vitro* e *in vivo*.
- 4 Alterar el estado de activación y la capacidad de proliferación de las células T *lpr*, variando los niveles de p21, y estudiar su influencia en el desarrollo de autoinmunidad.

célula T *lpr* de memoria



Esquema 9. Los objetivos de esta Tesis están orientados a estudiar la implicación de FAS en el control de la activación/proliferación de las células T durante una estimulación repetida, de manera independiente a su conocida función en apoptosis. Asimismo, se analizará la relevancia del estado de activación/proliferación de las células T *lpr* (controlado por los niveles de p21) en el desarrollo de la patología autoinmune de los ratones deficientes en FAS.

MATERIALES Y MÉTODOS

“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio.”

Gregorio Marañón. Médico y escritor español (1887-1960).

cultivos celulares

anexina

bazo

timidina tritiada

ciclo celular

ELISA

BrdU

CFSE

citoquinas

Kaplan Meier

Inmunofluorescencia

1. Cepas de ratones

Los ratones C57BL/6 se obtuvieron de Harlan Interfauna Ibérica.

La cepa C57BL/6-*lpr* (en adelante, *lpr*) deficiente en FAS fue suministrada por *Jackson Laboratory*.

Los ratones C57BL/6-p21^{-/-} (en adelante, p21^{-/-}) fueron obtenidos mediante el cruce de ratones p21^{-/-} 129/Sv (Laboratorio de Gregory Hanon, *Cold Spring Harbor Laboratory*) con ratones C57BL/6 durante ocho generaciones. La pureza del fondo de estos ratones se comprobó mediante tecnología de micro-satélites y es superior al 99 %, tal y como se describe en [37].

Los ratones C57BL/6-*lpr*-p21^{-/-} (en adelante, *lpr*-p21^{-/-}) se obtuvieron cruzando ratones C57BL/6-*lpr* con ratones C57BL/6-p21^{-/-} durante ocho generaciones.

Los ratones C57BL/6-p21tg (en adelante, p21tg) fueron facilitados por el laboratorio del Doctor Arum Fotedar (*Sydney Kimmel Cancer Center*) [101]. Los ratones C57BL/6-*lpr*-p21tg (en adelante, *lpr*-p21tg) se obtuvieron cruzando ratones C57BL/6-*lpr* con ratones C57BL/6-p21tg durante ocho generaciones.

Los ratones MRL-*mp* se obtuvieron de Jackson Laboratory. Los ratones MRL-*lpr*-p21tg se generaron mediante retrocruce durante más de nueve generaciones de ratones C57BL/6-p21tg con ratones MRL-*lpr* (*Jackson Laboratory*). Tanto en los ratones MRL-*lpr*-p21tg, como en los ratones C57BL/6-*lpr*-p21tg y C57BL/6-p21tg, la expresión del transgén de p21 humano está controlada por el promotor proximal de *lck*, quedando restringida de este modo a las células T.

Los ratones B10BR fueron provistos por *Jackson Laboratory* y presentan un haplotipo H-2^k.

Los ratones PCC.TCRtg fueron generosamente facilitados por el Doctor Mark M. Davis (*Stanford University School of Medicine*) y expresan un transgén para un TCR que reconoce específicamente al péptido PCC 88-104 (citocromo c de paloma) [102]. Este receptor está formado por las cadenas α y β , que se pueden identificar mediante los marcadores de la región variable V α 11 y V β 3, respectivamente. Estos ratones tienen un 90 % de células V β 3⁺ V α 11⁺ [103] y un haplotipo H-2^k. Los ratones PCC.TCRtg-*lpr* se obtuvieron cruzando ratones PCC.TCRtg con ratones C57BL/6-*lpr* (haplotipo H-2^b) durante varias generaciones, en las que se conservó el haplotipo H-2^k.

2. Cultivos celulares

2.1. Medios de cultivo

En todos los casos se ha utilizado un medio de cultivo completo constituido por RPMI-1640 (Gibco, *Life*

Technologies) suplementado con un 10 % de suero de ternera fetal (FCS, Harlan, *Sera Lab*), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 µM de L-glutamina, 50 µM de β-mercaptoetanol, 1 mM de sodio-piruvato y 10 mM de HEPES pH 7,4 (todos ellos de Gibco, *Life Technologies*).

2.2. Aislamiento de células T CD4⁺ de ratón

Las células T CD4⁺ se aislaron de suspensiones celulares obtenidas a partir de bazos de ratón disgregados sobre un filtro de 40 µM (BD Bioscience) con RPMI-1640 + HEPES 10 mM. Para eliminar el exceso de eritrocitos se empleó un tampón de lisis (NH₄Cl al 0,83 %, KHCO₃ al 0,1 % y EDTA al 0,004 %) a temperatura ambiente (en adelante, TA) durante 5 minutos. La purificación de células T CD4⁺ se llevó a cabo mediante esferas magnéticas (*Dynabeads*, Invitrogen) cubiertas con anticuerpos monoclonales capaces de unirse a B220 (Mouse pan B) y a CD8. La suspensión celular obtenida en el paso anterior se resuspendió en RPMI-1640 + HEPES 10 mM y se incubó con esta mezcla de *Dynabeads* durante 30 minutos en hielo, en movimiento continuo. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo un proceso de selección magnética en el que aquellas células que tenían *Dynabeads* unidos en su superficie extracelular fueron sometidas a la acción atrayente de una columna magnética. De este modo, en el sobrenadante quedarían las células T CD4⁺ con una pureza superior al 80 %, tal y como se comprobó mediante citometría de flujo (en adelante, CMF) con un marcaje extracelular para TCRβ, CD4, CD8, B220 (ver Tabla 1 y apartado 4.1. de materiales y métodos).

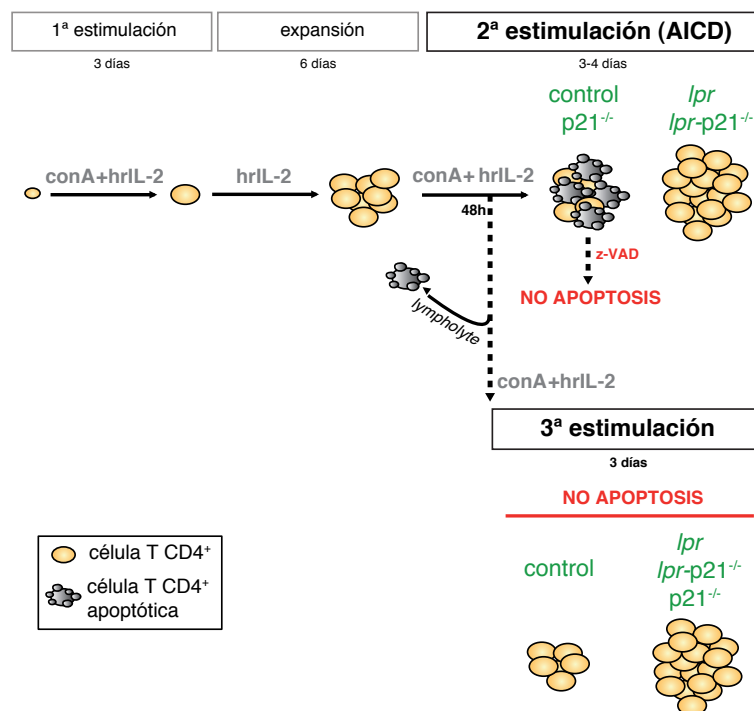
2.3. Obtención de células dendríticas de médula ósea de ratón

Las células dendríticas (en adelante, DC) se obtuvieron tal y como se ha descrito en [104]. En resumen, se disgregó médula ósea de fémur de ratón sobre un filtro de 40 µM con RPMI-1640 + HEPES 10 mM. Estas células fueron cultivadas a razón de $0,5 \times 10^6$ células/ml en medio completo junto GM-CSF (20 ng/ml) (del inglés, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) obtenido a partir de un sobrenadante producido por la línea celular de melanoma D5-G6 (amablemente cedida por el Dr. Abul Abbas, Universidad de California, San Francisco). Al tercer día de cultivo se añadió medio completo fresco + GM-CSF (20 ng/ml). Dos días después se transfirieron las células no adherentes (sobrenadante) a placas nuevas junto con aquellas células que estaban débilmente unidas a la placa y que fueron levantadas mediante el uso de EDTA 3 mM en PBS 1X (tampón fosfato salino) durante 1 minuto. En esta ocasión, además de GM-CSF (20 ng/ml) se añadió interleuquina-4 (1 ng/ml), que fue obtenida a partir de la línea celular I3L6 (cedida por el Dr. Abul Abbas). Siete días después de iniciar el cultivo, se añadió 1 µg/ml de LPS (*Escherichia coli* O26:B6; Sigma Aldrich) para favorecer la maduración de las DC y péptido PCC 88-104 (1 µM) para que fuese captado por estas células presentadoras. Transcurridas 20 horas, se recogieron las células no adherentes junto con aquellas que estaban unidas débilmente a la placa y se realizó un marcaje de CMF con los anticuerpos anti-B7-2 (CD86) y anti-I-A^k (MHC II, haplotipo H-2^k) (Tabla 1). El por-

centaje medio de células con señal positiva para ambos anticuerpos fue del 75 %, indicando una elevada capacidad para presentar el antígeno PCC.

2.4. Protocolo de estimulaciones repetidas *in vitro*

Para simular una situación de muerte celular inducida por activación (AICD) bajo condiciones controladas, se estimuló de manera repetida a las células T CD4⁺ (aisladas tal y como se ha descrito anteriormente) (ver apartado 3.2. de introducción). Para ello, las células T CD4⁺ fueron estimuladas durante tres días con 3 µg/ml de concanavalina A (en adelante conA, Sigma Aldrich) junto con 20 ng/ml de IL-2 recombinante humana (el adelante hrIL-2, Peprotech) a una concentración de 1x10⁶ células/ml. Una vez transcurrida esta *estimulación primaria*, las células fueron lavadas y resuspendidas en medio RPMI completo suplementado con hrIL-2 (20 ng/ml) a una concentración de 0,5x10⁶ células/ml durante tres días, tras los cuales se volvió a cambiar el medio bajo las mismas condiciones durante tres días más. Después esta *fase de expansión* con hrIL-2, las células T fueron re-estimuladas bajo las mismas condiciones que en la estimulación primaria durante tres días. Esta *estimulación secundaria* provoca unos niveles de hasta el 90 % de muerte celular inducida por activación (AICD), excepto en el caso de las células T deficientes en FAS, que son resistentes a la apoptosis. Para eliminar la diferente susceptibilidad apoptótica entre las células T deficientes en FAS y el resto de células, en algunos experimentos se añadió a los cultivos el inhibidor de la actividad caspasa z-VAD (del inglés, *benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone*; Bachem) a 50 µM [105] (esquema 11).



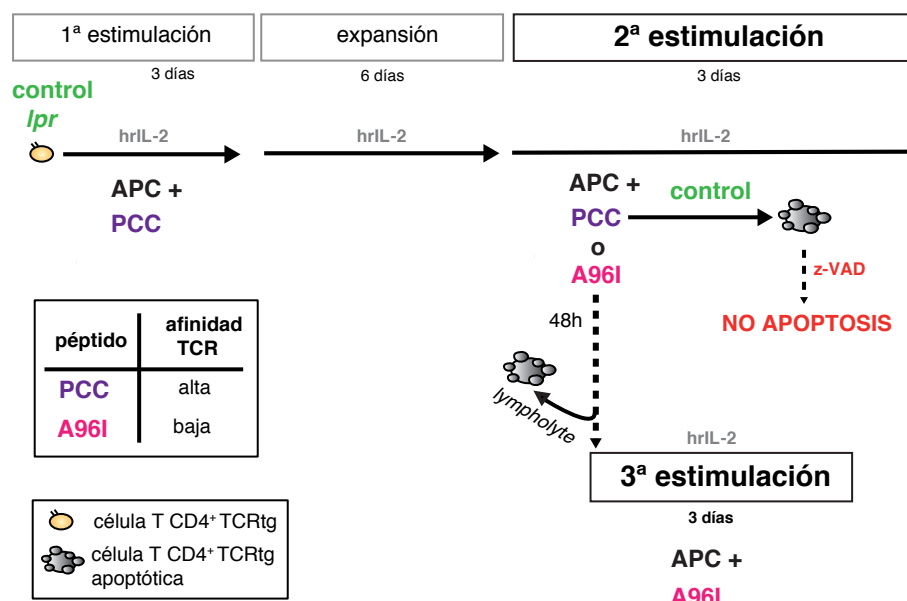
Esquema 11. Protocolo de estimulaciones repetidas *in vitro* con conA (3 µg/ml) y hr-IL-2 (20 ng/ml) en células T CD4⁺ control (C57BL/6), p21^{-/-}, lpr o lpr-p21^{-/-}.

Otra aproximación que se puede utilizar para evitar las diferencias en la inducción de apoptosis entre las células T *lpr* y el resto de linfocitos T, consiste en aislar a las células supervivientes a las 48 h de una 2ª estimulación. Para ello, se eliminaron las células muertas mediante centrifugación por gradiente de densidad (*lympholyte*, Cedarlane) a 2700 rpm durante 20 minutos a 25°C. De este modo sólo se recuperan las células vivas, que fueron estimuladas de nuevo con conA (3 µg/ml) y hrIL-2 (20 ng/ml) durante una 3ª estimulación en la que no hay inducción de apoptosis.

En algunos casos se añadió al cultivo el inhibidor de la fosforilación de ERK-1/2, U0126 (del inglés, *1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene*; Cell Signaling) [106], a una concentración de 10 µM o el inhibidor de la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$, BAY 11-7082 (del inglés, *(E)-3-(4-Methylphenylsulfonyl)-2-propenenitrile*, Sigma-Aldrich) [107], utilizado a 10 µM.

2.5. Cultivos mixtos de células T CD4⁺ y células presentadoras de antígeno

En estos cultivos se utilizaron APC para presentar el péptido PCC o A96I a células CD4⁺ TCRtg aisladas del bazo de ratones PCC.TCRtg o PCC.TCRtg-*lpr*, tal y como se ha descrito anteriormente. Las APC se obtuvieron a partir de bazos de ratones B10BR disgregados sobre un filtro de 40 µM. Tras lisar los eritrocitos, las APC restantes fueron irradiadas a 30 grays para impedir su proliferación.



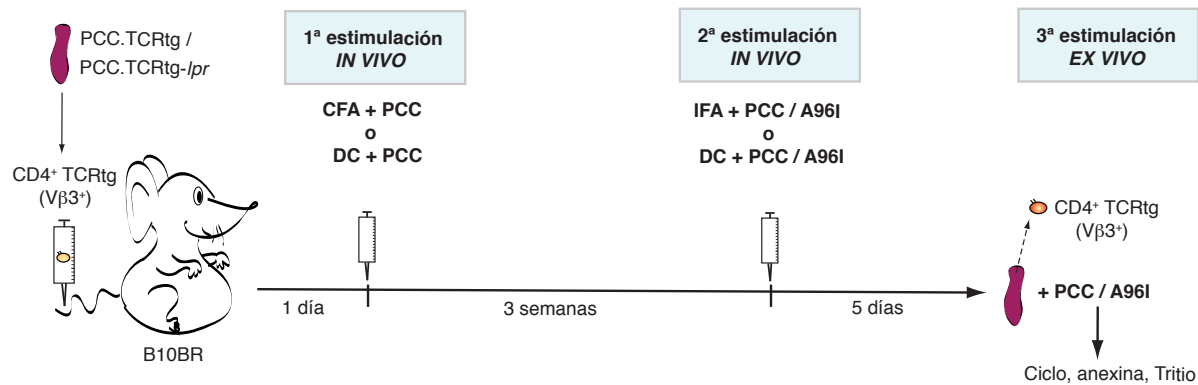
Esquema 12. Protocolo de estimulaciones repetidas in vitro de células CD4⁺ TCRtg control (PCC.TCRtg) o *lpr* (PCC.TCRtg-*lpr*) con APC irradiadas + péptido de alta (PCC) o baja (A96I) afinidad para el TCR.

Dado que las células T CD4⁺ *naïve* presentan una menor afinidad por el péptido + MHC II que las células T de memoria [108], se añadió un péptido agonista de alta afinidad para el TCR (PCC, KAERADLIA-YLKQATAK) a una concentración de 3 µM + hrIL-2 (20 ng/ml) durante la *estimulación primaria* de las células CD4⁺ TCRtg *naïve*. En esta 1ª estimulación se utilizó una relación de células CD4⁺ TCRtg frente

a APC de 1:4, a razón de $0,5 \times 10^6$ células $CD4^+$ TCRtg /ml. Después de 3 días, las células se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI completo suplementado con hrIL-2 (20 ng/ml) a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml durante tres días, tras los cuales se repitió este proceso. Transcurridos estos seis días de *expansión*, las células se lavaron y se estimularon por segunda vez con APC irradiadas a una relación 1:2 de células $CD4^+$ TCRtg:APC, a razón de 1×10^6 células $CD4^+$ TCRtg/ml. En esta 2ª *estimulación* se utilizaron varias concentraciones de PCC o de un péptido agonista de baja afinidad para el TCR (A96I, sintetizado por sustitución de alanina por isoleucina en la posición 96 del péptido PCC: KAE-RADLIYLYKQATAK)[109, 110] junto con hrIL-2 (20 ng/ml). En algunos cultivos se estimularon las células $CD4^+$ TCRtg supervivientes a las 48 h de una estimulación secundaria (obtenidas por centrifugación por gradiente de densidad) por tercera vez con A96I, bajo las mismas condiciones que en una 2ª estimulación (esquema 12).

3. Transferencia adoptiva de células T $CD4^+$

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de las células T $CD4^+$ bajo un contexto fisiológico, se aislaron estas células de ratones PCC.TCRtg y PCC.TCRtg-*lpr* y, tras varios lavados con PBS 1X estéril, se inyectaron $5-10 \times 10^6$ células $CD4^+$ TCRtg ($V\beta 3^+$) vía intravenosa en la cola de ratones receptores B10BR. En todos los casos, los ratones donantes y receptores tenían el mismo sexo y haplotipo (H-2^k), condición indispensable para evitar rechazos de las células transferidas. Al día siguiente, los ratones receptores se estimularon con una emulsión preparada a partir de adyuvante completo de Freund (en adelante CFA, del inglés *Complete Freund's Adjuvant*; DIFCO) (100 μ l) + péptido PCC (100 μ g) que fue administrada mediante inyección intraperitoneal. En algunos experimentos la estimulación se realizó con 2×10^6 DC maduras cargadas con PCC (1 μ M), que fueron inyectadas de manera intravenosa. Transcurridas 3 semanas, estos ratones se re-estimularon con una emulsión preparada con adyuvante incompleto de Freund (en adelante IFA, del inglés *Incomplete Freund's Adjuvant*; Sigma) (100 μ l) y péptido de alta (PCC, 100 μ g) o baja (A96I, 200 μ g) afinidad para el TCR, mediante inyección intraperitoneal. Algunos ratones fueron re-estimulados con DC maduras cargadas con PCC o A96I (1 μ M) que se inyectaron directamente en la vena de la cola. Estos ratones receptores se sacrificaron 5 días después de esta segunda estimulación. Tras aislar el bazo y lisar los eritrocitos, las suspensiones celulares obtenidas se estimularon por 3ª vez *ex vivo* con PCC fuerte o A96I (1 μ M), a razón de 5×10^6 células/ml (esquema 13).



Esquema 13. Transferencia adoptiva de células T CD4⁺. Las células T CD4⁺ PCC.TCRtg o PCC.TCRtg-*lpr* (Vβ3⁺) fueron transferidas a ratones receptores B10BR, donde se estimularon dos veces *in vivo* con adyuvante + péptido PCC / A96I o con DC maduras + péptido PCC / A96I. Cinco días después de la 2ª estimulación *in vivo*, las células del bazo de los ratones receptores fueron estimuladas por tercera vez *ex vivo* con PCC / A96I y se procedió al análisis de la activación y proliferación de estas células.

4. Citometría de flujo

4.1. Marcaje extracelular

En todas las tinciones de marcadores de superficie se recogieron 0,5x10⁶ células en tubos de CMF y se incubaron con la mezcla de anticuerpos correspondiente a cada experimento en un volumen final de 30 µl de PBS suplementado (PBS 1X con un 5 % de FCS, 1 % de albúmina de suero bovino y 5 mM de EDTA) durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados y se resuspendieron las células en 500 µl de PBS suplementado antes de ser recolectadas en el citómetro *FC 500* o *Gallios* (Beckman Coulter).

El análisis de los resultados obtenidos por CMF se realizó con el programa *FlowJo* (*Tree Star Inc.*, versión 8.8.3).

ESPECIFICIDAD- FLUOROCROMO	CASA	ISOTIPO
Anexina-FITC	Beckman Coulter	
Anexina-PE	Immunostep	
Avidina-FITC	Beckman Coulter	
Avidina-PE	Beckman Coulter	
B220-SPRD	Beckman Coulter	Rata IgG2aκ
B220-APC	Beckman Coulter	Rata IgG2aκ

B7-2-PE (CD86)	Pharmingen	Rata IgG2 κ
BrdU-FITC	Becton Dickinson	Ratón IgG1
CD4-FITC	Beckman Coulter	Rata IgG2b κ
CD4-PE-Cy7	eBioscience	Rata IgG2b κ
CD4-SPRD	Beckman Coulter	Rata IgG2b κ
CD8-PE	Beckman Coulter	Rata IgG2 $\alpha\kappa$
CD25-FITC	Pharmingen	Rata IgM κ
CD44-FITC	Beckman Coulter	Rata IgG1 κ
CD62L-APC	eBioscience	Rata IgG2 $\alpha\kappa$
CD69-FITC	eBioscience	Hamster IgG1 κ
CD69-PE	Pharmingen	Hamster IgG1 κ
I-A ^k -FITC	Serotec	Ratón IgG2a
IFN- γ -APC	eBioscience	Rata IgG1 κ
IL-2-APC	Pharmingen	Rata IgG2b
IL-17-APC	eBioscience	Rata IgG2 κ
TCR- β -FITC	Pharmingen	Hámster IgG2
V β 3-PE	Pharmingen	Hámster IgG2 κ
V β 3-FITC	Pharmingen	Hámster IgG1 κ

Tabla 1. Anticuerpos acoplados a fluorocromos para el marcaje de células de ratón.

4.2. Citoquinas intracelulares

Para estudiar los niveles de citoquinas intracelulares se disgregó el bazo de los ratones correspondientes a cada experimento y, tras lisar el exceso de glóbulos rojos, las células restantes se transfirieron a una placa a razón de 5×10^6 células/ml. En aquellos experimentos donde se analizó la producción de citoquinas en cultivos *in vitro*, se estimularon 1×10^6 células/ml. La estimulación se realizó con PMA (del inglés, *phorbol-12-myristate-13-acetate*) (50 ng/ml) junto con ionomicina (2 μ g/ml). Después de 1 hora de estimulación a 37°C, se detuvo la secreción de proteínas con Brefeldina A (2 μ g/ml), un compuesto que desorganiza el aparato de Golgi y se utiliza para retener a las proteínas en el citoplasma. Tres horas más tarde, se recogieron estas células y en algunos casos se realizó un marcaje extracelular (ver apartado anterior). Para fijar y permeabilizar las células se utilizó el kit BD *Cytofix/Cytoperm™-Fixation/Permeabilization solution* (BD Biosciences), tal y como se indica en las instrucciones del fabricante. Se utilizaron anticuerpos unidos a fluorocromos para detectar IL-2, IL-17 e IFN- γ (interferón- γ) (Tabla 1), que se incubaron durante 30 minutos a TA. Finalmente, las muestras se lavaron y se colectaron en el citómetro de flujo.

4.3. Anexina

Para detectar el porcentaje de células apoptóticas, definidas como anexina⁺ y Ioduro de Propidio⁻ (en adelante, IP), se realizó un marcaje de anexina (*ApoScreen V*, Beckman Coulter) y IP (*DNA Prep stain*, Beckman Coulter) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se resuspendieron 1×10^6 células en 100 μl del tampón proporcionado por el fabricante 1X a 4°C y se añadieron 10 μl de anexina-V marcada con un fluorocromo (Tabla 1). Transcurridos 15 minutos de incubación, se añadieron 10 μl de IP y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo.

5. Ensayos de proliferación *in vitro*

5.1. Incorporación de timidina tritiada

Tras cultivar las células en placas de 96 pocillos (Falcon), se midió la incorporación de timidina tritiada (Perkin Elmer) que se había añadido 16 horas antes (100 $\mu\text{Ci/pocillo}$). La cuantificación de la radioactividad incorporada se llevó a cabo en un contador *Beta-plate counter β 1205 Wallack* (Perkin Elmer), tras recoger las células en filtros de vidrio (Wallac) con un recolector (*Cell Harvester*, Wallac). La incorporación de timidina tritiada al ADN es proporcional a la capacidad de síntesis de las células.

5.2. Marcaje con CFSE

El CFSE (del inglés, *5-6-carboxifluorescein diacetate succinimidyl ester*; Molecular Probes) es una sonda fluorescente que se une a proteínas intracelulares y se reparte de manera equitativa entre las dos células hijas tras una división celular [111]. La intensidad del CFSE disminuye de manera proporcional al número de divisiones de las células. Para llevar a cabo la incubación de esta sonda, se resuspendieron las células T CD4⁺ a razón de 1×10^6 células/ml en PBS 1X + BSA (del inglés, *Bovine Serum Albumin*) 0,1% precalentado y el CFSE se añadió a una concentración final de 2,5 μM . Tras 45 minutos de incubación a 37°C, este compuesto se diluyó añadiendo medio completo y las células se incubaron en hielo durante 10 minutos para detener la tinción. A continuación, las células se lavaron dos veces con medio completo a 4°C y se estimularon según las condiciones de cada experimento.

La pérdida de intensidad de la señal del CFSE se midió por citometría de flujo transcurridos 3-4 días desde el inicio del marcaje. Con la intención de estudiar la señal de esta sonda tan sólo en las células vivas, antes de colectar las muestras en el citómetro de flujo se añadieron 10 μl de IP o se realizó un marcaje con anexina-V + IP (ver apartado 4.3. de materiales y métodos)(Tabla 1). A continuación, se analizó la señal de CFSE tan sólo en las células con señal negativa para IP y anexina-V.

En algunos cultivos mixtos las células CD4⁺ TCRtg se tiñeron con CFSE antes de juntarlas con las APC.

5.3. Incorporación de BrdU

Para medir la proliferación de las células T en condiciones fisiológicas, se utilizó la técnica de incorporación del análogo de base BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina, Sigma Aldrich) al ADN descrita en [112]. El BrdU fue administrado en el agua de los ratones a razón de 0,8 mg/ml durante nueve días (renovándose cada 2 días) y transcurrido este tiempo los animales fueron sacrificados. A continuación, se prepararon las suspensiones celulares a partir de los ganglios linfáticos cervicales de estos ratones. Primero se realizó un marcaje extracelular de CMF (ver apartado 4.1. de materiales y métodos y tabla 1) para definir las diferentes poblaciones de células T. A continuación, se permeabilizaron las células resuspendiéndolas en NaCl 0,15 M y Etanol 90 % a -20°C. Al día siguiente, se trataron las células con PBS 1X-paraformaldehído 1 %-tween 1 % (Merck) durante 30 minutos a TA, seguidos de 30 minutos en hielo. Tras esta fijación, se realizó la digestión del ADN con la enzima DNasa I (100U/ml, Roche) en una solución (NaCl 0,15 M, MgCl 4,2 mM, HCl 10 µM) que se incubó exactamente 10 minutos a TA. Finalmente, se realizó una tinción intracelular con 10 µl del anticuerpo anti-BrdU (ver tabla 1) durante 1 hora a TA. Tras lavar las células, se analizaron en el citómetro de flujo.

Esta técnica también se empleó en algunos cultivos que se incubaron con BrdU 20 µM durante 3 horas antes de empezar la tinción.

5.4. Tinción de ciclo celular

Para analizar las distintas fases del ciclo celular, se recogieron $0,5 \times 10^6$ células en tubos de CMF en los tiempos indicados y se incubaron con 50 µl de detergente para permeabilizar las células y 500 µl de IP para teñir el ADN (*DNA-Prep reagent kit*, Beckman Coulter, ambos productos) a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se colectaron las muestras en el citómetro de flujo.

En algunos casos se realizó una tinción extracelular previa (ver apartado 4.1. de materiales y métodos), seguida de una permeabilización con EtOH 70 % a -20°C. Al día siguiente, se lavaron las muestras con PBS 1X y se incubaron con IP diluido al 50 % con PBS 1X durante 30 minutos a 37°C, antes de analizarlas en el citómetro de flujo.

5.5. Conteo de células

Se utilizó el aparato CASY (*Schärfe System*) para realizar el conteo a partir de una suspensión celular. En todos los casos se consideraron como células T CD4⁺ *naïve* aquellas con un tamaño de 5 µm y células activadas aquellas con un tamaño igual o superior a 7 µm. Se repitió dos veces cada medición y se calculó el valor medio de las mismas.

6. Ensayos Bioquímicos

6.1. Western blot

Las muestras de proteínas se obtuvieron mediante un lisado de las células T CD4⁺, que habían sido previamente congeladas a -80°C. Para llevar a cabo este proceso, se resuspendieron las muestras en un tampón compuesto por Tris HCl 50 mM pH 7,4 con un 1 % de NP-40, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 1 mM de PMSF, 1 mM de Ortodovanato y una mezcla de inhibidores de fosfatasas (Roche) y proteasas (Roche), y se incubaron durante 20 minutos en hielo. Tras cuantificar la concentración de proteína de cada muestra, mediante un ensayo de *Bradford* (Bio-Rad), se cargaron cantidades iguales de proteína (30-50 µg) en geles de acrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes. La transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) se realizó utilizando un aparato de electrotransferencia semi-seca (Bio-Rad). A continuación, se bloquearon las membranas con leche al 5 % en TBS 1X 0,05 % tween. Para identificar las proteínas en las membranas se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios para ratón: ERK-1/2, fosfo-ERK-1/2, IκB-α, fosfo-IκB-α, IKKα, IKKβ, fosfo-IKKαβ (Cell Signaling), p21 (Santa Cruz Biotechnology) y β-actina (Sigma Aldrich) como control de carga, diluidos según las instrucciones del fabricante. Finalmente, para detectar la señal de cada proteína se utilizaron diferentes anticuerpos secundarios policlonales unidos a la peroxidasa HRP (Dako). El revelado de estas membranas se llevó a cabo mediante el uso del potenciador de quimioluminiscencia ECL (Perkin Elmer), cuya señal fue recogida en películas de Rayos-X (Konica Minolta).

6.2. Ensayo de retardo en gel (EMSA)

Los lisados nucleares se obtuvieron de la manera indicada a continuación. Tras descongelar las muestras, compuestas por 10x10⁶ células guardadas a -80°C, se centrifugaron y este decantado celular se resuspendió en 1 ml de tampón A (Tabla 2) en hielo durante 5 minutos. Tras centrifugar las muestras, el sobrenadante (fracción citosólica) se retiró y el decantado (fracción nuclear) se lavó con 500 µl de tampón B (Tabla 2) sin llegar a resuspenderlo. Se centrifugaron las muestras de nuevo las muestras, se descartó el sobrenadante y el resto se resuspendió en 50 µl de buffer C (Tabla 2) durante 30 minutos en hielo con agitación. Se centrifugó de nuevo, y el sobrenadante de estas preparaciones constituiría la suspensión de proteínas nucleares, cuya concentración fue determinada mediante un ensayo de *Bradford* (Bio-Rad). Estas muestras se unieron a varias sondas marcadas con radioactividad, tal y como se indica a continuación. Se utilizaron diferentes sondas de cadena doble con secuencias específicas para la unión de los factores de transcripción NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', Promega), NFAT (5'-GCGC-CAAAGAGGAAAATTTGTTTCATA-3', Santa Cruz Biotechnology, Inc) o AP-1 (5'-CGCTTGATGAGTCA-GCCGGAA-3', Promega). Para el marcaje radioactivo de estas sondas con ³²P (Hartmann Analytic) se utilizó la enzima T4 polinucleótido quinasa (Promega). A continuación, se incubó cada fracción nuclear

(5-10 μg) con 1,5 μg de poli(dI-dC) (del inglés, *polydeoxy(inosinate-cytidylate)*, *acid sodium salt*; USB corporation) y con 0,5 ng de sonda marcada con ^{32}P en un tampón de unión (glicerol 20 %, MgCl_2 1M, EDTA 0,5 M, DTT 1 M, NaCl 2 M, Tris HCl pH 7,5 5 %) durante 20 minutos a 25°C. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida (30 %, 37:5:1) al 6 % durante 2 horas a 300 V. Tras secar el gel, se colocó en su superficie una película de rayos-X que se expuso 12 horas a -80°C.

Reactivos	TAMPÓN A	TAMPÓN B	TAMPÓN C
Hepes pH 8,0	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	50 mM	50 mM	350 mM
Sacarosa	0,5 mM	-----	-----
EDTA pH 8,0	1 mM	0,1 mM	0,1 mM
Espermidina	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
Espermina	0,15 mM	0,15 mM	0,15 mM
Tritón X-100	0,5 %	-----	-----
Glicerol	-----	25 %	25 %
PMSF	1 mM	1 mM	1 mM
Pepstatina	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$
Aptotinina	0,2 U/ml	0,2 U/ml	0,2 U/ml
β -Mercaptoetanol	7 mM	7 mM	7 mM

Tabla 2. Tampones utilizados para la obtención de extractos nucleares.

7. Análisis serológicos e histológicos

7.1. Anticuerpos anti-ADN en suero

Los anticuerpos anti-ADN de cadena doble contenidos en el suero de ratones se detectaron mediante una técnica convencional de ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). El primer paso consistió en tapizar placas de 96 pocillos (*Maxisorp*, Nunc) con polilisina (Sigma Aldrich, 1,5 mg/ml) durante 1 hora a 37°C y, a continuación, se añadió ADN desnaturalizado de timo de ternero (Sigma Aldrich, 2,5 $\mu\text{g/ml}$) durante toda la noche a 4°C para favorecer su unión a la placa. Al día siguiente, se bloquearon los pocillos con tampón A (Tabla 3) durante 1,5 horas. Tras varios lavados con tampón T (Tabla 3), se incubaron en la placa las diferentes diluciones de suero de ratón (empezando por una dilución 1:200 hasta 1:3.200) en tampón B (Tabla 3) durante 1,5 horas a TA. Transcurrido este tiempo, se volvieron a lavar las

muestras con tampón T. A continuación, los pocillos se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con la peroxidada HRP (Dako) (disuelto en el tampón C (Tabla 3)), durante 1,5 horas a TA en oscuridad. En algunos casos se utilizaron los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgGM anti-ratón, acoplados a la peroxidada HRP (Southern Biotechnology Associates, Inc). Las muestras se revelaron con el substrato OPD (Sigma) durante 30 minutos a TA, y a continuación se paró la reacción con H_2SO_4 . Los niveles de absorbancia relativos se leyeron en un dispositivo *Labsystems Multiskan Plus Plate Reader*, a 492 nm.

REACTIVOS	TAMPÓN T	TAMPÓN A	TAMPÓN B	TAMPÓN C
Timerosal	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,01 %
Tween 20	0,05 %		0,05 %	0,05 %
Gelatina		0,1%	0,1 %	
δ -globulina bovina			0,075 %	0,1 %
BSA			0,1 %	0,5 %

Tabla 3. Tampones para ELISA preparados a partir de PBS 1X.

7.2. Cortes parafinados de riñones de ratón

Los riñones de ratón se fijaron en PBS 1X-paraformaldehído 2 % (Sigma Aldrich) durante 4 horas a TA y, a continuación, se deshidrataron mediante un tratamiento con EtOH 70 % a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se continuó el proceso de deshidratación con una serie de inmersiones consecutivas de 30 minutos en alcoholes etílicos de concentraciones crecientes (80 %, 90 % y 100 %). Para el aclarado de las muestras se utilizó xilol (Merck). La confección del bloque de parafina se llevó a cabo introduciendo los órganos en moldes de plástico en los que se añadió *Paraplast Plus* (Sigma Aldrich). Una vez solidificados los bloques, se realizaron cortes del tejido de 7 μm de espesor con un microtomo (*Leica RM2155*). Estas secciones se depositaron sobre portas, cuya superficie fue cubierta previamente con polilisina-L (Sigma), y se dejaron secar a 37°C.

Como paso previo a la tinción de estos cortes se realizó el desparafinado de los mismos mediante 3 lavados de 5 minutos en Xileno (Panreac). La hidratación de los cortes se realizó sumergiendo las muestras durante 3 minutos en concentraciones decrecientes de EtOH 100 %, 95 %, 70 % y, finalmente, agua destilada. La tinción del núcleo se realizó sumergiendo los portas en una solución acuosa del colorante básico hematoxilina de Mayer (Sigma Aldrich) durante 5 minutos. Tras lavar las muestras con agua del grifo, éstas recibieron un tratamiento con metanol 70 % (Merck) + HCl 1 % (Merck) de 5 minutos. Los citoplasmas se tiñeron con una solución acuosa ácida de eosina (Sigma Aldrich) diluida al 50 % con ácido acético 1 %, y finalmente se lavaron con agua para retirar el exceso de colorante. Como medio de mon-

taje, para adherir el cubre objetos de vidrio a la superficie de la muestra se utilizó entellán (Merck). Las imágenes de los cortes fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia invertido *Olympus 1X70*.

7.3. Evaluación del grado de glomerulonefritis

La severidad de la glomerulonefritis se evaluó a partir de cortes parafinados de riñón de ratón, obtenidos tal y como se ha descrito en el apartado anterior. La gravedad de esta inflamación se clasificó del 0 al 4 según la escala de Berden [113], siendo 0 = sin daño, 1 = aumento mínimo del mesangio, 2 = aumento medio del mesangio con inflamación glomerular, 3 = aumento del mesangio, inflamación glomerular y adhesiones capsulares, 4 = alteración de la arquitectura glomerular superior al 70 %, formación de cilindros tubulares. Los resultados de la evaluación fueron confirmados por la Doctora Juana Flores, del Departamento de Biología animal de la Facultad de Veterinaria (Universidad Complutense de Madrid).

7.4. Inmunofluorescencia en criocortes de riñón

Tras sacrificar a los ratones, los riñones extraídos fueron embebidos en una solución de inclusión (*Jung Tissue Freezing medium*, Leica Microsystems) y rápidamente congelados en nitrógeno líquido. Los criocortes se realizaron en un criostato (*Leica CM1900*) a 7 μm de espesor y las secciones fueron recogidas en portas (Fischer) que se dejaron secar a TA durante 2 h. Transcurrido este tiempo, los cortes se trataron con acetona fría ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 10 minutos a 4°C . Tras esta fijación, las muestras se dejaron secar durante 30 minutos. A continuación, se bloquearon los cortes con PBS suplementado con un 2 % de BSA y un 10 % de suero de cabra durante 1 h a TA. Para retirar el exceso de solución de bloqueo, los cortes se lavaron tres veces con PBS 1X (5 minutos cada lavado). Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con el fluorocromo FITC (Southern), diluido en PBS 1X-2,5 % de suero de cabra durante toda la noche a 4°C . Para finalizar, las preparaciones se lavaron tres veces con PBS 1X, y se montaron con el medio *Vectashield H-1200* + DAPI (del inglés, *4',6-diamidino-2-phenylindole*) (Vector Laboratories). La tinción fue evaluada en un microscopio confocal de fluorescencia *Olympus Fluoview FV1000*.

7.5. Medida de citoquinas en sobrenadante

Para medir los niveles de las citoquinas IL-2, IL-17 e IFN- γ , se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares y se incubaron con un kit de microesferas específicas para cada citoquina (*Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Immunoassay*, Millipore). El espectro de emisión de cada una de estas microesferas es único, lo que posibilita la identificación simultánea de todas ellas. Finalmente, se analizaron las muestras por duplicado en el aparato *Luminex 100 IS*, donde las microesferas son obligadas a pasar por una corriente de flujo y cada una de ellas es clasificada de acuerdo a su marcaje fluorescente.

8. Estadística

- El **valor p** para todos los análisis estadísticos se obtuvo aplicando el Test de la T de Student. En este caso, los p -valores $< 0,05$ se consideran estadísticamente significativos. Los p -valores se representaron de la siguiente manera:

$p\text{-valor} < 0,001 = (***)$

$p\text{-valor} < 0,01 = (**)$

$p\text{-valor} < 0,05 = (*)$

- El porcentaje de supervivencia de los ratones fue calculado por el método de **Kaplan Meier** con el programa *GraphPad Prism V.5*.

RESULTADOS

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”

Isaac Newton. Matemático y físico británico (1642-1727).

hiperactivación 2ª estimulación
C57BL/6-lpr autoinmundiad in vitro
in vivo lpr-p21tg PCC lpr-p21^{-/-} memoria
A96I 1ª estimulación

1. Fenotipo de los ratones C57BL/6-*lpr*

1.1. Hiperplasia de los órganos linfoides secundarios y acumulación de células T doble negativas hiperproliferativas en ratones *lpr*

Entre los modelos murinos que desarrollan enfermedades autoinmunes de manera espontánea cabe destacar a los ratones *lpr* [45]. El fenotipo de estos ratones está asociado a una expresión defectuosa de FAS y se caracteriza por una notable linfadenopatía, esplenomegalia, una elevada presencia de autoanticuerpos, hipergammaglobulemia, nefritis, artritis, y una destacada acumulación de células T doble negativas (TCR- α/β^+ B220 $^+$ CD4 $^-$ CD8 $^+$) y células T de memoria [62]. El origen de la enfermedad autoinmune de los ratones *lpr* es desconocido y no puede explicarse únicamente por su defecto en apoptosis (ver introducción, apartado 4.1. y 4.2.). Por lo tanto, se estudiaron posibles propiedades alternativas de FAS, independientes a su papel pro-apoptótico, que ayudasen a explicar este fenotipo. En este trabajo se han utilizado ratones C57BL/6-*lpr* (en adelante, *lpr*) en comparación con ratones C57BL/6 (en adelante, control) para estudiar el efecto de la ausencia de FAS en un fondo genético que no potencia el desarrollo de autoinmunidad. En este modelo murino la enfermedad se desarrolla de manera más lenta que en otros fondos genéticos pro-autoinmunes como el MRL-*mp*, sin llegar a ser letal.

Como se ha descrito previamente, los ratones *lpr* muestran un característico aumento de los órganos linfoides secundarios. A los 8 meses de edad, los ratones deficientes en FAS presentan un notable aumento en el tamaño del bazo (control 3,18 vs. *lpr* 7,59 mg bazo/peso total) (Fig. 1A) y de los ganglios linfáticos (control 0,28 vs. *lpr* 2,67 mg ganglios axilares/peso total y control 0,38 vs. *lpr* 9,17 mg ganglios cervicales/peso total) (Fig. 1B).

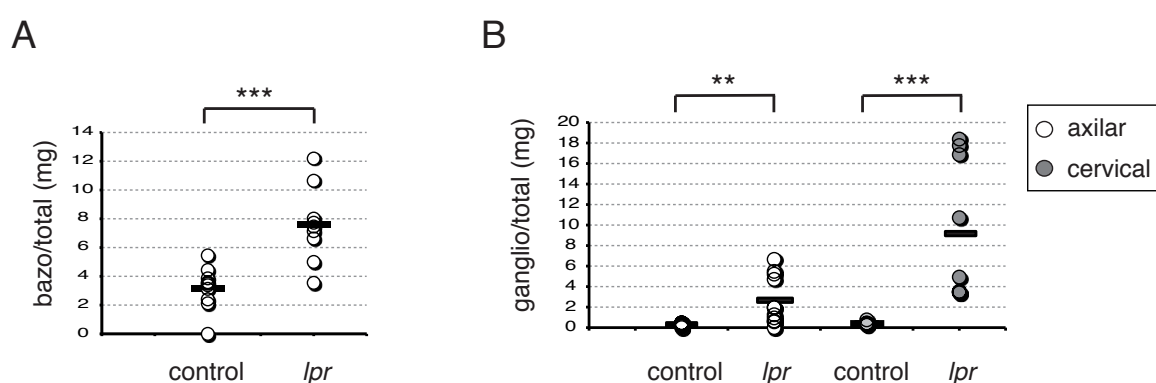


Figura 1. Aumento de tamaño de los órganos linfoides secundarios en ratones C57BL/6-*lpr*

Peso del bazo (A), ganglios linfáticos axilares y cervicales (B) relativo al peso total de ratones control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) de 8 meses de edad. La barra negra indica el valor promedio (n=10). Las cifras del p-valor (**, ***) son menores a 0,01 y 0,001 respectivamente.

Originalmente se pensaba que la adenopatía de los ratones *lpr* se debía a una acumulación de células T Doble Negativas anérgicas debido a su defecto en apoptosis [46]. Más tarde se ha descrito que estas células T DN no solamente no son anérgicas, si no que además hiperproliferan *in vivo* en ratones MRL-*lpr* [66] y C56BL/6-*lpr* [67]. En estos trabajos se describe una acumulación excesiva de BrdU *in vivo* en las células T de los ratones deficientes en FAS, indicando una alta tasa de proliferación. Sin embargo, actualmente se desconoce el origen de esta hiperproliferación, así como su relación con la ausencia de FAS y con el desarrollo del fenotipo de los ratones *lpr*.

Se ha comprobado que los ratones de nuestra colonia muestran las propiedades descritas anteriormente. De este modo, existe una llamativa acumulación de células T DN ($\text{TCR-}\beta^+ \text{ B220}^+ \text{ CD4}^- \text{ CD8}^-$) en la periferia, cuyo porcentaje es 40 veces superior en los ratones *lpr* en comparación con los ratones control a los 8 meses de edad (Fig. 2A). Estas células T DN tienen un elevado potencial proliferativo *in vivo* en los ratones *lpr* de 2 meses de edad, llegando a alcanzar niveles de incorporación de BrdU 4 veces superiores respecto a los ratones control (Fig. 2B). Se ha propuesto que la mayoría de las células T DN se originan a partir de las células T CD8^+ [114, 115]. En concordancia con la ventaja proliferativa detectada en las células T DN, las células T CD8^+ tienen una mayor incorporación de BrdU *in vivo* en los ratones *lpr* que en los ratones control de 2 meses (Fig. 2C).

Por lo tanto, el fenotipo de los ratones *lpr* está asociado a la acumulación de una población aberrante de células T DN hiperproliferativas *in vivo*.

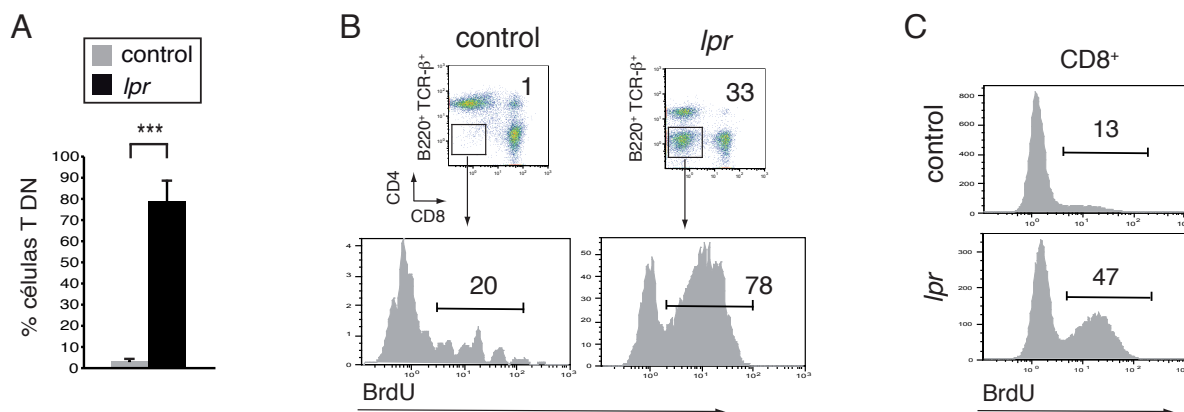


Figura 2. Aumento de células T doble negativas hiperproliferativas en ratones C57BL/6-*lpr*

(A) Media y desviación estándar del porcentaje de células T Doble Negativas ($\text{TCR-}\beta^+ \text{ B220}^+ \text{ CD4}^- \text{ CD8}^-$) detectadas en los nódulos linfáticos cervicales de ratones control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) de 8 meses de edad (n=8). El *p*-valor (***) es inferior a 0,001. Incorporación *in vivo* de BrdU en las células T DN (B) y CD8^+ (C) de ganglios linfáticos cervicales de ratones control y *lpr* de 2 meses de edad. Se muestra un experimento representativo (n=6). Los ratones estuvieron bebiendo BrdU disuelto en agua (0,8 mg/ml) durante 9 días consecutivos

1.2. Ventaja proliferativa de las células T CD4⁺ y T CD4⁺ de memoria *lpr* *in vivo*

A pesar de los múltiples estudios realizados con ratones deficientes en FAS, la etiología de su linfadenopatía y de su enfermedad sigue siendo desconocida. La hiperplasia de los órganos linfoides secundarios de los ratones *lpr* no puede atribuirse solamente a una acumulación de células T DN hiperproliferativas. Los estudios realizados con ratones deficientes en CTLA-4 o IL2-R muestran una notable linfadenopatía asociada a una acumulación masiva de linfocitos activados, pero no presentan células T DN [116-118]. Por lo tanto, se examinó la influencia de otras células T en el desarrollo del fenotipo de los ratones deficientes en FAS. Las células T CD4⁺ son las principales reguladoras de la respuesta inmune adaptativa, y muchas enfermedades autoinmunes se producen como consecuencia de su pérdida de tolerancia frente a antígenos propios [119]. Por lo tanto, en esta Tesis se estudió el efecto de la ausencia de FAS en la activación y proliferación de las células T CD4⁺.

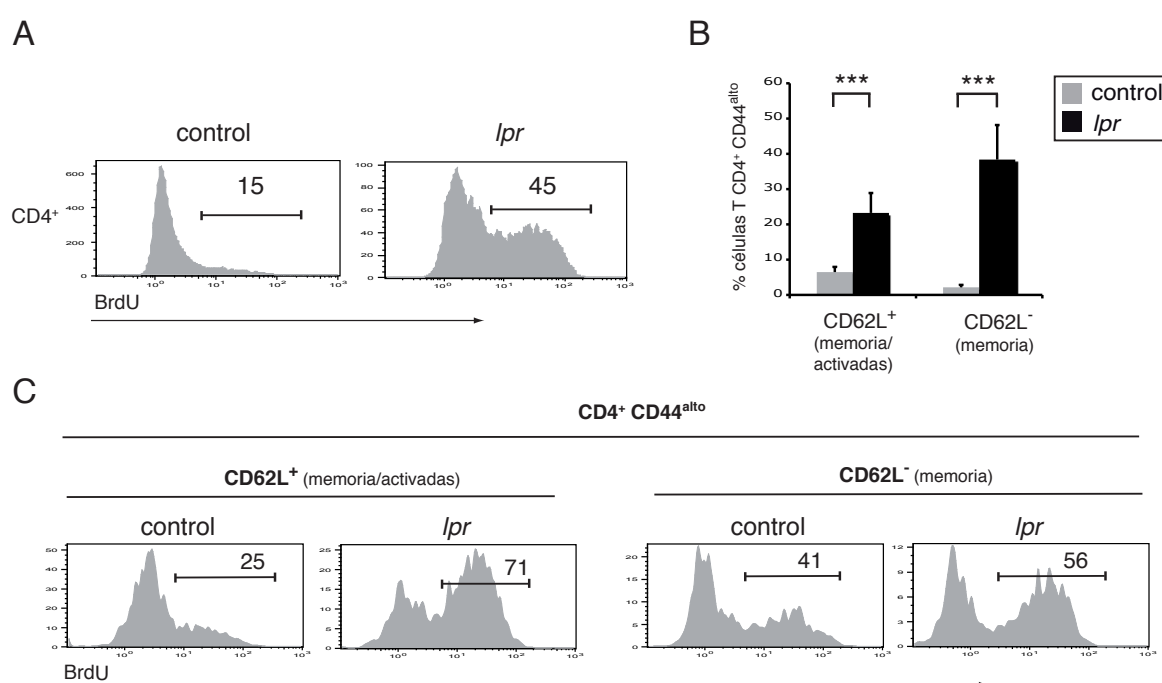


Figura 3. Hiperproliferación de las células T CD4⁺ y células T CD4⁺ de memoria en ratones C57BL/6-*lpr*

(A) Cuantificación del BrdU incorporado *in vivo* en las células T CD4⁺ de nódulos linfáticos cervicales de ratones control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) de 2 meses de edad. Se muestra un experimento representativo de 3 independientes (n=8). (B) Promedio y desviación estándar del porcentaje de células T CD4⁺ CD44^{alto} CD62L⁺ (memoria/activadas) o CD62L⁻ (memoria) en nódulos linfáticos cervicales de ratones control y *lpr* de 8 meses de edad (n=8). Las cifras del *p*-valor (***) son inferiores a 0,001. (C) Incorporación de BrdU *in vivo* en células T CD4⁺ CD44^{alto} CD62L⁺/⁻ obtenidas a partir de nódulos linfáticos cervicales de ratones control y *lpr* de 2 meses de edad (n=4). Se muestra un experimento representativo de 3. En (A) y en (C) los ratones bebieron BrdU (0,8 mg/ml) disuelto en agua durante 9 días consecutivos.

Las células T CD4⁺ de los ratones *lpr* muestran una clara ventaja proliferativa *in vivo*, llegando a incorporar niveles de BrdU 3 veces superiores a los detectados en los nódulos linfáticos de ratones control de 2 meses de edad (Fig. 3A). Cabe destacar el alto porcentaje de células T CD4⁺ con fenotipo de memoria/activadas (CD44^{alto}/CD62L⁺) y de memoria (CD44^{alto}/CD62L⁻) encontrado en los órganos linfoides secundarios de los ratones deficientes en FAS (CD44^{alto}/CD62L⁺: control 6,47 vs. *lpr* 23,25 % y CD44^{alto}/CD62L⁻: control 2,15 vs. *lpr* 38,37 %, 8 meses de edad) (Fig. 3B). Además, ambas poblaciones de células T CD4⁺ CD44^{alto} muestran una clara ventaja proliferativa *in vivo* en los ratones *lpr*. Esta hiperproliferación es más llamativa en las células T CD4⁺ CD44^{alto}/CD62L⁺ deficientes en FAS (control 25 vs. *lpr* 71 % BrdU incorporado) que en las células T CD4⁺ CD44^{alto}/CD62L⁻ (control 41 % vs. *lpr* 56 % BrdU incorporado) (Fig. 3D).

Estos resultados parecen indicar que la hiperproliferación detectada *in vivo* en las células T CD4⁺ y en las células T CD4⁺ de memoria/activada (CD44^{alto}/CD62L⁺) de los ratones *lpr* podría ser una consecuencia directa de la deficiencia en FAS. Esta llamativa proliferación podría explicar, en parte, el origen de la adenopatía encontrada en los ratones *lpr*. Por lo tanto, se estudió en profundidad la excesiva proliferación de las células T CD4⁺, así como su implicación en el desarrollo del fenotipo autoinmune de los ratones *lpr*.

2. Estudio de la proliferación de las células T CD4⁺ *lpr* *in vitro*

2.1. Una primera estimulación *in vitro* no genera diferencias en la proliferación de las células T CD4⁺ *lpr* y control

Estudios previos indican que, bajo condiciones incompletas de estimulación, FAS ejerce un control positivo en la proliferación primaria de células T humanas [120]. Se estudiaron las características proliferativas de las células T CD4⁺ *lpr* tras una primera estimulación *in vitro* con un estímulo policlonal inespecífico como es la conA (Fig. 4A). El análisis del ciclo celular de linfocitos T CD4⁺ *naïve* control y *lpr* durante una 1ª estimulación revela unos porcentajes similares de células en las fases S-G2-M, bajo los mismos niveles de muerte basal (Fig. 4B). Esta similitud en la capacidad proliferativa de las células T CD4⁺ deficientes en FAS y control se confirmó mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada al ADN, en el que tampoco se detectaron diferencias significativas en la capacidad de síntesis (control: 19.400 vs. *lpr*: 23.700 cpm, *p*-valor = 0,06) (Fig. 4C). Otro método utilizado para medir la capacidad proliferativa de las células consiste en analizar la dilución de la señal de CFSE. Esta sonda es incorporada en el interior de las células T CD4⁺ antes de que éstas reciban el estímulo a través de su TCR. En cada división celular el nivel de intensidad de CFSE desciende a la mitad como consecuencia de la división del citoplasma. Por lo tanto, el número de divisiones celulares es directamente proporcional a la pérdida de fluorescencia de la sonda [111]. Para excluir del análisis a las células muertas se combinó el marcaje de CFSE con IP, un agente intercalante del ADN. Se analizó la pérdida de intensidad de fluorescencia de CFSE en las células

T CD4⁺ al final de una estimulación primaria y, en concordancia con los datos anteriores, no se detectaron diferencias en la proliferación primaria entre las células control y *lpr* (Fig. 4D). Se muestran las 0 h de la estimulación primaria como referencia del recorrido de la señal.

Estos resultados indican que, durante una estimulación primaria con conA la deficiencia en FAS no tiene un efecto significativo en la respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ *naïve*.

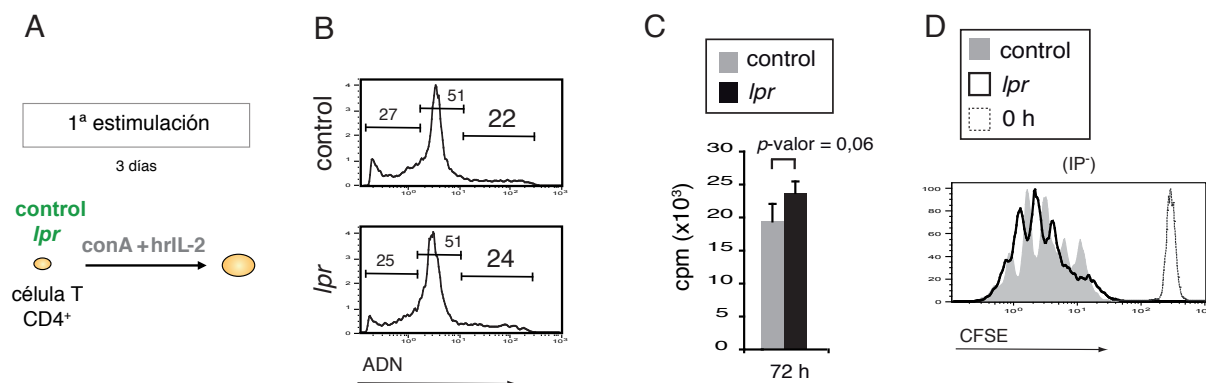


Figura 4. Las células T CD4⁺ control y *lpr* muestran una proliferación similar durante una 1ª estimulación *in vitro*

(A) Estimulación primaria *in vitro* de células T CD4⁺ *naïve* control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) con conA (3 µg/ml) y hr-IL-2 (20 ng/ml). Se utilizaron 1 x 10⁶ células T CD4⁺/ml. (B) Porcentaje de células T CD4⁺ control y *lpr* en las fases del ciclo celular de muerte/G0-G1/S-G2-M (de izquierda a derecha) a las 72 h de una estimulación primaria. Se enseña un experimento representativo de 4 independientes. (C) Incorporación de timidina tritiada en células T CD4⁺ control y *lpr* a las 72 h de una primera estimulación. Los datos muestran la media y la desviación estándar (n=5). (D) Marcaje de CFSE en células T CD4⁺ control y *lpr* a las 72 h de una estimulación primaria. Se muestran las células IP negativas y las 0 h antes de la estimulación. Este experimento es representativo de un total de 4 independientes.

2.2. Hiperproliferación de las células T CD4⁺ deficientes en FAS durante una segunda estimulación *in vitro*

En un ambiente fisiológico las células T auto-reactivas se encuentran varias veces con el mismo antígeno en el organismo. Para estimular de manera repetida a las células T CD4⁺ *in vitro*, se ha utilizado un protocolo en el cual tras activar a las células *naïve* con conA + hrIL-2, éstas se expanden en presencia de hrIL-2 y finalmente se vuelven a estimular con conA + hrIL-2 (Fig. 5A). Durante esta segunda estimulación tiene lugar una muerte inducida por activación (AICD) solamente en las células T CD4⁺ control, puesto que las células *lpr* son deficientes en FAS. Para eludir esta diferencia en la susceptibilidad apoptótica, en algunos experimentos se ha utilizado el inhibidor de caspasas z-VAD. Este compuesto tiene la capacidad de unirse de forma específica al centro activo de diferentes caspasas, impidiendo su auto-procesamiento y posterior activación [105].

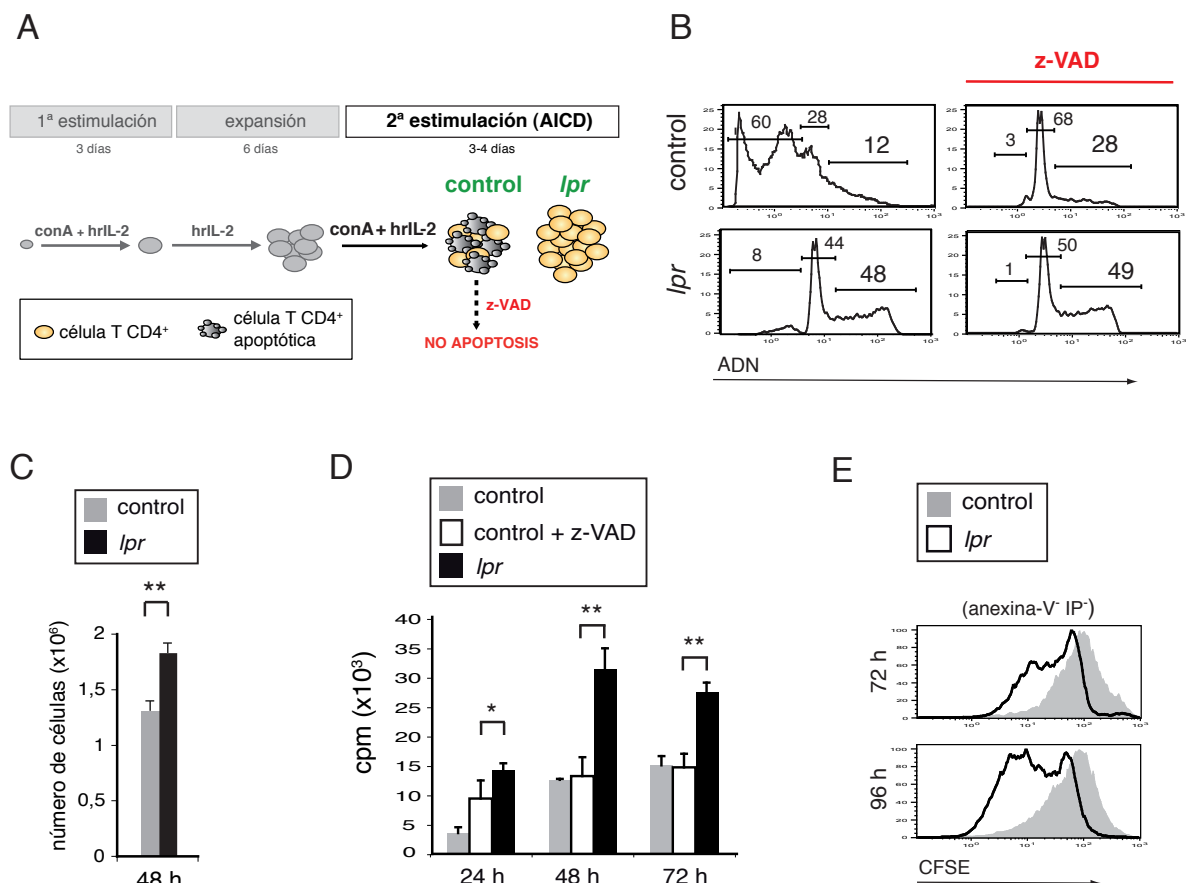


Figura 5. Hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr* durante una 2ª estimulación *in vitro*

(A) Estimulación secundaria *in vitro* de células T CD4⁺ control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) con conA (3 µg/ml) y hrIL-2 (20 ng/ml). En algunos casos la muerte celular inducida por activación (AICD) se inhibió con z-VAD (50 µM). Se utilizaron 1x10⁶ células T CD4⁺/ml. (B) Análisis del ciclo celular en células T CD4⁺ control y *lpr* a las 24 h de una 2ª estimulación. De izquierda a derecha, se muestran los porcentajes de las células contenidas en las fases de muerte-apoptosis/G0-G1/S-G2-M. En el panel derecho se utilizó el inhibidor z-VAD (50 µM). Se enseña un experimento representativo de 5 independientes. (C) Promedio y desviación estándar del número de células T CD4⁺ control y *lpr* a las 48 h de una 2ª estimulación en presencia de z-VAD (50 µM) (n=3). (D) Incorporación de timidina tritiada en células T CD4⁺ control y *lpr* durante una 2ª estimulación. La muerte de las células control se inhibió con z-VAD (50 µM). Los datos muestran la media y la desviación estándar (n=4). (E) Tinción de CFSE en las células T CD4⁺ control y *lpr* a las 72 y 96 h de una 2ª estimulación. Las células con señal positiva para IP y anexina-V han sido excluidas del análisis. Este experimento es representativo de un total de 4. El p-valor (*, **) es inferior a 0,05 y 0,01 respectivamente.

El análisis del ciclo celular a las 24 h de una 2ª estimulación con conA revela una evidente inducción de apoptosis en las células T CD4⁺ control (panel izquierdo, Fig. 5B). Mediante el uso de z-VAD se mimetizó la ausencia de muerte de las células T CD4⁺ *lpr* en las células T CD4⁺ control (panel derecho, Fig. 5B). Bajo estas condiciones de igualdad de sensibilidad apoptótica, se observó una clara ventaja proliferativa de la células T CD4⁺ *lpr* (control: 28 vs. *lpr*: 49 % de células en las fases del ciclo celular S-G2-M, Fig. 5B).

También se ha detectado una mayor acumulación de células T CD4⁺ *lpr* respecto a las células control a las 48 h de una estimulación secundaria en presencia de z-VAD (control: 1,31 vs. *lpr*: 1,86x10⁶ células Fig. 5C). En concordancia con estos datos, se ha observado un aumento significativo en la incorporación de timidina tritiada en las células T CD4⁺ *lpr* a las 24 h de una 2^a estimulación (Fig. 5D). Esta diferencia se hace más evidente a las 48 y 72 h y es indicativa de una mayor capacidad de síntesis en las células T CD4⁺ deficientes en FAS. Por último, en la tinción con CFSE se observa una mayor dilución de la sonda en las células T CD4⁺ *lpr* al final de una estimulación secundaria (Fig. 5E). Aquí se muestran las células T CD4⁺ con señal negativa para un doble marcaje con anexina-V y IP. Por lo tanto, esta técnica confirma que, en ausencia de FAS, existe una mayor proporción de células que han culminado la mitosis. En esta figura de CFSE no aparecen los típicos picos indicativos del porcentaje de células correspondiente a cada número de división. Esta técnica ha sido establecida para una estimulación primaria, por lo que puede haber variaciones en el resultado de la misma al ser utilizada en una estimulación repetida con conA. El movimiento de la sonda en conjunto puede deberse a una sincronización en la división de las células durante el período de expansión con hrIL-2, o a una tinción no uniforme debido a la heterogeneidad de tamaños [111].

Estos resultados ponen en evidencia que, la ausencia de FAS tiene como consecuencia una mayor capacidad proliferativa de las células T CD4⁺ respecto a las células control durante una 2^a estimulación.

2.3. FAS regula negativamente la proliferación de las células T CD4⁺ durante una re-estimulación sin inducción de apoptosis

Podría argumentarse que la ventaja proliferativa de las células T CD4⁺ deficientes en FAS detectada durante una 2^a estimulación *in vitro* se debe, en realidad, a una simple acumulación de las células *lpr* resistentes a la apoptosis inducida por activación. Se pueden llevar a cabo diferentes estrategias para resolver la diferencia en la sensibilidad apoptótica observada entre las células T CD4⁺ control y *lpr*. Se ha utilizado una nueva aproximación para estudiar el comportamiento de las células T CD4⁺ supervivientes a la apoptosis inducida tras una 2^a estimulación, centrada en el estudio de la respuesta proliferativa durante una 3^a estimulación *in vitro*, donde no hay inducción de apoptosis.

La muerte apoptótica inducida tras una 2^a estimulación con conA + hr-IL2 se reduce notablemente a las 48 h. En este momento, se recuperaron las células T CD4⁺ vivas eliminando los restos de células muertas mediante una centrifugación con gradiente de densidad (*lympholyte*) y se volvieron a estimular con conA + hr-IL2. Un día después de esta 3^a estimulación se detectaron unos mayores niveles de proliferación en ausencia de FAS (control: 25 vs. *lpr*: 38 % de células en las fases del ciclo S-G2-M), bajo condiciones de muerte basal similares (Fig. 6A). La ausencia de muerte inducida por activación en este protocolo fue confirmada mediante una tinción con anexina-V y IP, donde tanto las células T control como *lpr* mostraron

solamente alrededor de un 10 % de muerte (Fig. 6B). La ventaja proliferativa de las células T CD4⁺ *lpr* durante una 3^a estimulación fue corroborada por su significativo aumento en la incorporación de timidina tritiada (control: 44,270 vs. *lpr*: 131,150 cpm, *p*-valor = 0,0001) (Fig. 6C). Los datos de dilución de la señal de CFSE muestran, asimismo, una mayor proliferación de las células T CD4⁺ *lpr*. En este análisis se excluyeron las células con niveles basales de muerte mediante un marcaje con IP (Fig. 6D).

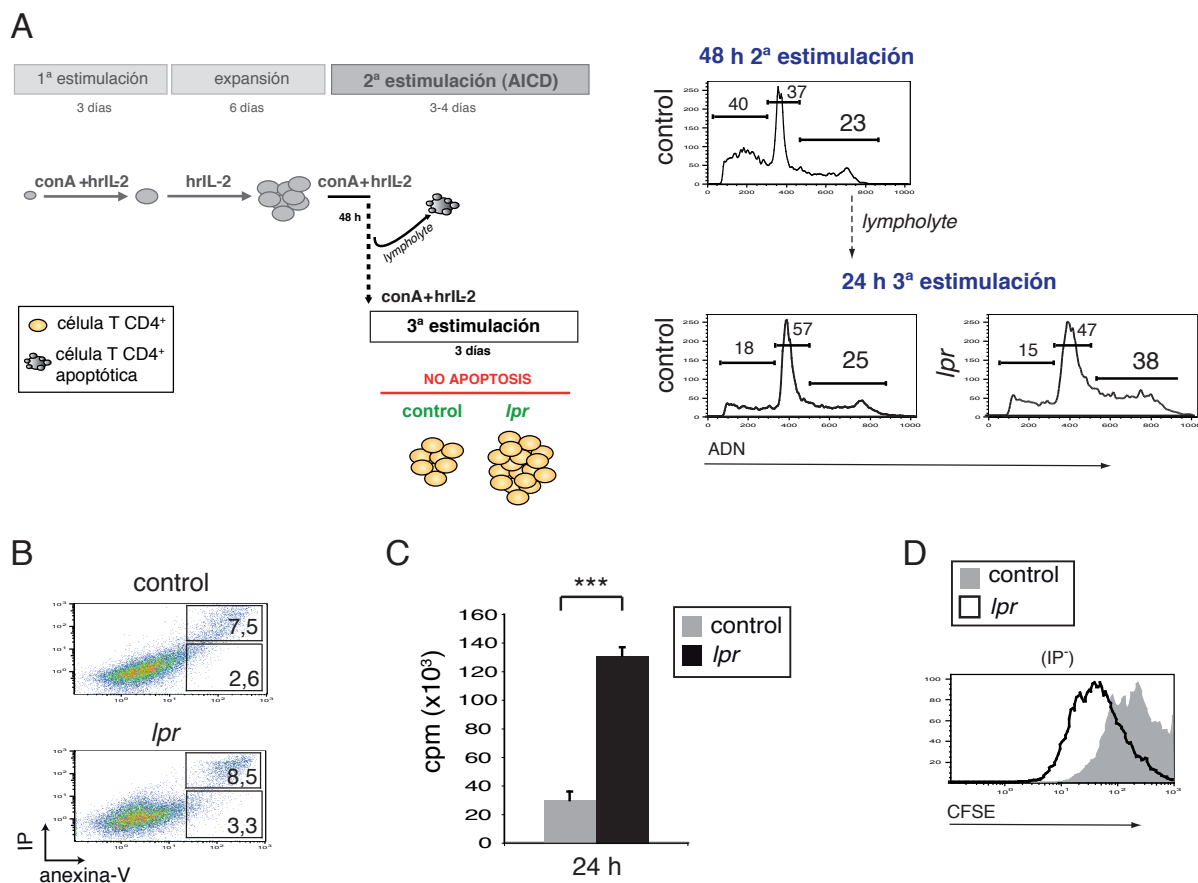


Figura 6. Ventaja proliferativa de las células T CD4⁺ *lpr* durante una re-estimulación *in vitro* en condiciones libres de apoptosis

(A) A las 48 h de una 2^a estimulación *in vitro* las células muertas fueron retiradas por centrifugación por gradiente de densidad (*lympholyte*) y las células vivas se estimularon de nuevo con conA (3 µg/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml) en condiciones libres de apoptosis. Se utilizaron 1x10⁶ células T CD4⁺/ml. En el panel derecho se muestra el análisis del ciclo celular con los porcentajes de muerte-apoptosis/G0-G1/S-G2-M (de izquierda a derecha) en las células T CD4⁺ control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) durante una 2^a y una 3^a estimulación. Se muestra un experimento representativo de 5 independientes. (B) Porcentaje de células T CD4⁺ control y *lpr* con marcaje positivo para anexina-V y con señal positiva y negativa para Ioduro de Propidio a las 24 h de una 3^a estimulación. Este experimento es representativo de un total de 3. (C) Incorporación de timidina tritiada en células T CD4⁺ control y *lpr* a las 24 h de una 3^a estimulación. Los datos muestran la media y la desviación estándar, *p*-valor < 0,001 (n=5). (D) Pérdida de la intensidad de fluorescencia de CFSE en células T CD4⁺ control y *lpr* a las 72 h de una 3^a estimulación. Se muestran las células IP negativas. Este experimento es representativo de un total de 3.

La elevada proliferación detectada en las células T CD4⁺ *lpr* durante una 3ª estimulación coincide con un estado hiperactivo de estas células, que presentan unos niveles de CD25 significativamente mayores que las células control (Fig. 7A). En base a en este estado hiperactivo de las células T CD4⁺ *lpr*, se ha analizado la producción de varias citoquinas pro-inflamatorias a las 3, 6, 12 y 24 h de una 3ª estimulación. A las 6 h de una 3ª estimulación *in vitro*, las células T CD4⁺ *lpr* liberan al medio una elevada cantidad de IFN- γ (control: 1.590 vs. *lpr*: 5.270 pg/ml), IL-2 (control: 1 vs. *lpr*: 3,5 pg/ml) e IL-17 (control: 3,2 vs. *lpr*: 12,8 pg/ml) (se obtuvieron resultados similares en el resto de horas analizadas, datos no mostrados) (Fig. 7B). En concordancia con estos resultados, en ratones deficientes en FAS de 2 meses de edad se encontraron unos altos niveles de los marcadores de activación CD25 y CD69 en las células T CD4⁺, en comparación con los ratones control (Fig. 7C).

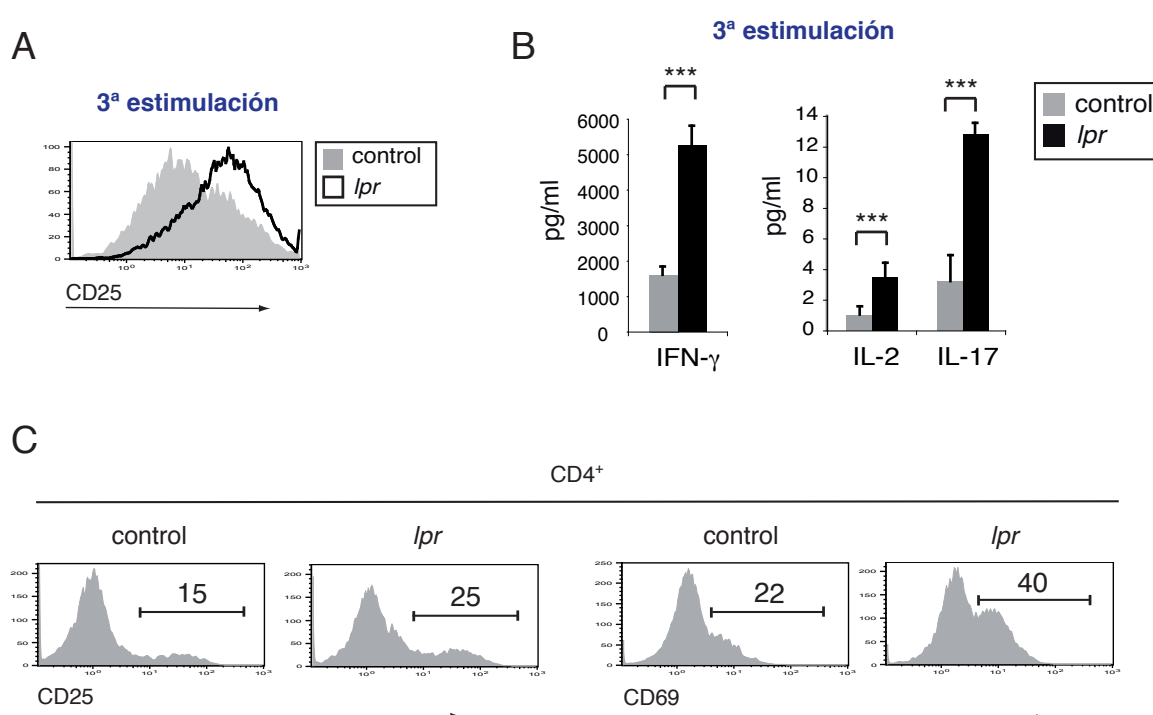


Figura 7. FAS regula negativamente la activación de las células T CD4⁺

(A) Niveles de CD25 medidos en las células T CD4⁺ control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) a las 24 h de una 3ª estimulación con conA (3 μ g/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml). Experimento representativo de un total de 3. (B) Promedio y desviación estándar de la cantidad (pg/ml) de citoquinas pro-inflamatorias medidas en el sobrenadante de cultivos de células T CD4⁺ control y *lpr* a las 6 h de una 3ª estimulación con conA (3 μ g/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml) (n=3). El p-valor (***) es menor a 0,001. (C) Niveles de CD25 y CD69 en las células T CD4⁺ del bazo de ratones control y *lpr* de 2 meses de edad. Se muestra un resultado representativo, n=4.

Estos resultados confirman que la nueva función de FAS relacionada con el control de la activación y proliferación de las células T CD4⁺ durante una re-estimulación *in vitro*, es independiente de su papel en apoptosis.

3. La hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr* durante una estimulación repetida *in vitro* depende de su hiperactivación

Dado que los resultados anteriores muestran una notable hiperproliferación de las células T *lpr* durante una estimulación repetida, se analizó si esta ventaja proliferativa podía deberse a un estado hiperactivo de las mismas. Se estudió la relación entre la ausencia de FAS y la activación de algunas rutas moleculares tras la estimulación del TCR, como NF- κ B y las MAP quinasas ERK-1/2.

3.1. La ventaja proliferativa de las células T CD4⁺ *lpr* está asociada a una hiperactivación de NF- κ B

Se estudiaron los niveles de activación de la ruta de NF- κ B en los diferentes estadios del protocolo de estimulaciones repetidas *in vitro* descrito anteriormente (esquema 11, materiales y métodos). El factor de transcripción NF- κ B está compuesto por dos subunidades (p50/p65) que se encuentran retenidas en el citoplasma por el inhibidor alpha de NF- κ B ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$). Tras la estimulación del TCR se pone en marcha una señalización celular que conduce a la activación del complejo $\text{IKK}\alpha\beta$. Este hecho promueve la fosforilación y posterior degradación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, liberándose de esta manera NF- κ B, que podrá translocarse al núcleo para ejercer su función como factor de transcripción (esquema 5, introducción)[21, 23].

Se analizó, mediante un ensayo de retardo en gel, la capacidad de unión de NF- κ B a una secuencia consenso de ADN en extractos nucleares recogidos a diferentes tiempos. Un mayor capacidad de unión es indicativa de una mayor activación del factor de transcripción. No se encontraron diferencias significativas en la actividad transcripcional de NF- κ B entre las células T CD4⁺ control y *lpr*, en los tiempos indicados de una primera estimulación *in vitro* (Fig. 8A). Sin embargo, durante una segunda estimulación el factor de transcripción NF- κ B presenta una mayor activación en las células T CD4⁺ *lpr* respecto a las células control (Fig. 8B, izquierda). Para igualar las condiciones de muerte durante esta 2ª estimulación se añadió z-VAD y, bajo estas condiciones, se observa de nuevo una hiperactivación de NF- κ B en las células T CD4⁺ *lpr* (Fig. 8B, derecha). Previamente se ha comprobado que z-VAD no afecta a la hiperactivación de NF- κ B encontrada en las células T deficientes en FAS (datos no mostrados de EMSA +/- z-VAD). Durante una 3ª estimulación también se observa una llamativa activación de NF- κ B desde las 0 h en ausencia de FAS (Fig. 8C). Este hecho se debe a que estas células son recogidas a las 48 h de una 2ª estimulación, cuando este factor de transcripción ya muestra unos niveles de activación muy elevados. Durante esta re-estimulación libre de apoptosis la elevada capacidad de unión al ADN de NF- κ B en las células T CD4⁺ deficientes en FAS se sostiene en el tiempo. En correlación con estos datos, se comprobó que durante una 3ª estimulación en las células T CD4⁺ *lpr* se produce un rápido aumento en la fosforilación del complejo $\text{IKK}\alpha\beta$ y, consecuentemente, una mayor fosforilación y una total degradación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (Fig. 8D).

En base a estos resultados, se puede concluir que la ausencia de FAS conduce a una mayor activación de la ruta de NF- κ B en células T CD4⁺ estimuladas repetidamente.

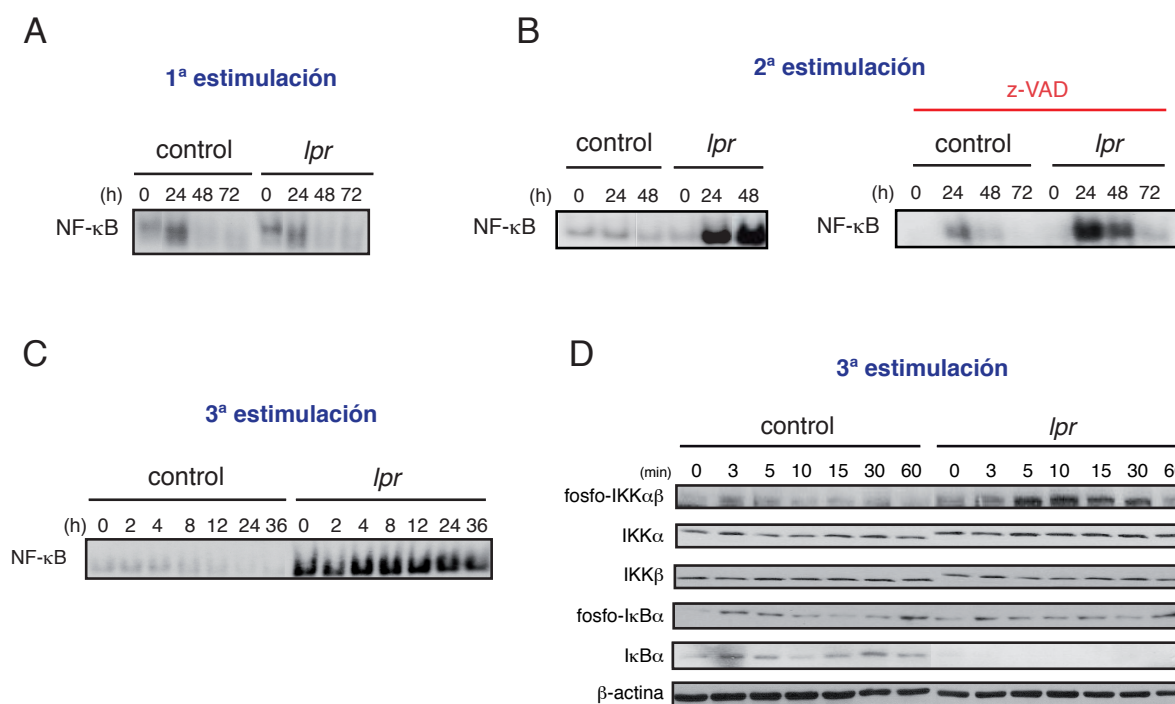


Figura 8. Hiperactivación de la ruta de NF- κ B en células T CD4⁺ *lpr* estimuladas de manera repetida

Ensayo de EMSA en el que se midió la activación de NF- κ B con una sonda específica para favorecer su unión. Los extractos nucleares pertenecen a células T CD4⁺ control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) y fueron recogidos en los tiempos indicados de una estimulación con conA (3 μ g/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml) primaria (A), secundaria (B) o terciaria (C). En (B) se inhibió la muerte inducida durante una 2ª estimulación con z-VAD (50 μ M). Todos los resultados son representativos de un total de 2 experimentos independientes. (D) Análisis por Western blot de la ruta de activación de NF- κ B en lisados de células T CD4⁺ control y *lpr* recogidos durante una 3ª estimulación con conA (3 μ g/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml) en los tiempos indicados. Se analizó la cinética de fosforilación del complejo IKK $\alpha\beta$ y de IkB α , así como la degradación de este último. Como controles de carga se utilizaron anticuerpos contra IKK α , IKK β y β -actina. Experimento representativo de un total de 2.

Además de NF- κ B, otros factores de transcripción como NFAT o AP-1 también son activados tras la estimulación del TCR y llevan a cabo un importante papel en la proliferación y diferenciación de las células T [121]. Se analizaron los niveles de activación de ambos factores de transcripción en células T *lpr* y control durante una 3ª estimulación *in vitro*. El análisis de la actividad transcripcional de AP-1, mediante un ensayo de EMSA, reveló un evidente incremento en su activación en las células T CD4⁺ *lpr* a partir de las 8 h (Fig. 9A). La EMSA realizada para detectar la capacidad de unión al ADN de NFAT muestra una baja activación en ambos tipos celulares a las horas analizadas, aunque se detecta un pico de activación a las 8 h en las células deficientes en FAS (Fig. 9B).

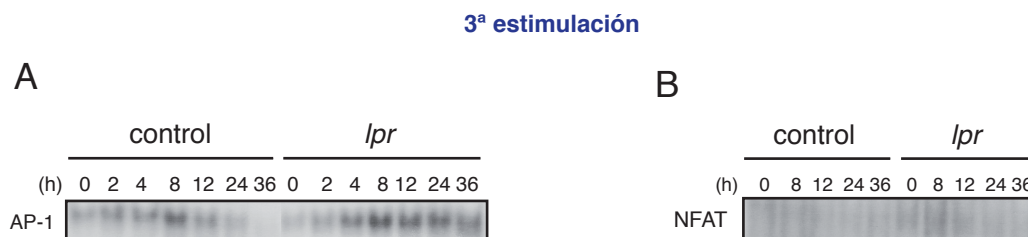


Figura 9. Estado de activación de AP-1 y NFAT en células T CD4⁺ control y *lpr*

Activación de AP-1 (A) y NFAT (B) cuantificada mediante EMSA con una sonda de unión específica para cada factor de transcripción. Los extractos nucleares pertenecen a células T CD4⁺ control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) recogidas en los tiempos indicados de una 3ª estimulación con conA (3 µg/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml). Experimento representativo de un total de 2.

El análisis de la activación de diferentes factores de transcripción en las células T CD4⁺ *lpr* estimuladas repetidamente reveló una interesante hiperactivación de NF-κB y, en menor medida, de AP-1 y NFAT. Por lo tanto, se centró este estudio en la ruta de NF-κB. Para comprobar la relevancia de la activación de NF-κB en el comportamiento hiperproliferativo de las células T CD4⁺ deficientes en FAS, se utilizó el inhibidor de la fosforilación de IκBα, BAY 11-7082 [107], durante una 3ª estimulación *in vitro*. Este inhibidor reduce de manera efectiva la capacidad de unión de NF-κB al ADN. Se utilizó la concentración de 10 µM, al ser la más eficaz sin resultar demasiado elevada (Fig. 10A). El análisis del ciclo celular durante una 3ª estimulación muestra como el tratamiento con BAY 11-7082 reduce a la mitad los niveles de proliferación (% células en las fases S-G2-M) de las células T CD4⁺ *lpr*, sin afectar a las células control (Fig. 10B). Este efecto específico del inhibidor fue confirmado mediante un ensayo de incorporación de timidina durante una 3ª estimulación, donde el tratamiento con BAY 11-7082 provocó una reducción en la capacidad de síntesis más significativa en las células T CD4⁺ *lpr* (*lpr* DMSO: 131.150 vs. *lpr* BAY 11-7082: 44.300 cpm, *p*-valor = 0,004) que en las células control (control DMSO: 29.900 vs. control BAY 11-7082: 14.800 cpm, *p*-valor = 0,045) (Fig. 10C). Además, la dilución de la señal de CFSE en respuesta a una 3ª estimulación del TCR se retuvo en las células T CD4⁺ *lpr* tratadas con BAY 11-7082, mientras que este efecto no fue tan notable en las células control (Fig. 10D).

En conjunto, estos datos indican que la hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr* durante una estimulación repetida depende, al menos, del incremento en los niveles de activación de NF-κB.

3ª estimulación

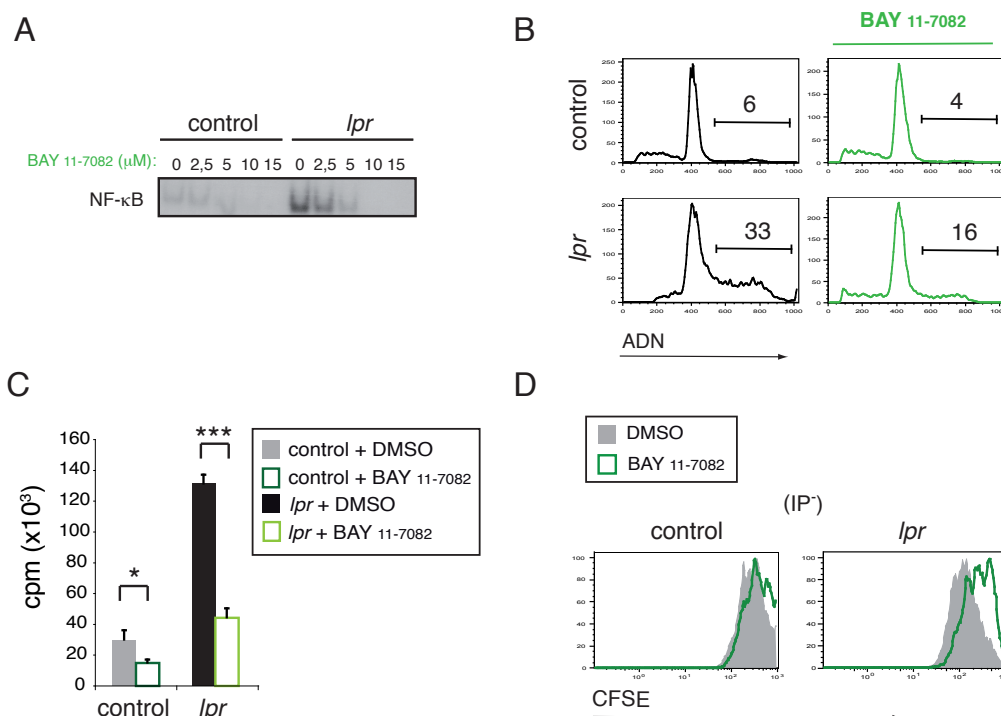


Figura 10. La hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr* estimuladas de manera repetida depende de NF-κB

Se muestran los resultados obtenidos durante una 3ª estimulación con conA (3 μg/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml). (A) Ensayo de EMSA en el que se utilizó una sonda específica para NF-κB. Los extractos nucleares pertenecen a células T CD4⁺ control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) recogidas a las 2 h de una 3ª estimulación. En ambos cultivos se añadieron concentraciones crecientes del inhibidor de IκBα, BAY 11-7082. (B) Se indica el porcentaje de células T CD4⁺ control y *lpr* en las fases del ciclo celular S-G2-M a las 24 h de una 3ª estimulación. En el panel derecho se enseñan las muestras donde se añadió el inhibidor BAY 11-7082 (10 μM) y en el panel izquierdo se añadió DMSO. Se muestra un experimento representativo de 3 independientes. (C) Incorporación de timidina tritiada en células T CD4⁺ control y *lpr* a las 24 h de una 3ª estimulación en presencia del inhibidor BAY 11-7082 (10 μM) o DMSO. Los datos muestran la media y la desviación estándar (n=8). El p-valor (*, ***) es menor a 0,05 o 0,001, respectivamente. (D) Señal de CFSE a las 72 h de una 3ª estimulación en células T CD4⁺ control y *lpr* tratadas con BAY 11-7082 (10 μM) o DMSO. Se muestran las células IP negativas. Este experimento es representativo de un total de 3.

3.2. FAS regula negativamente la activación de ERK-1/2 durante una estimulación repetida

Las MAP-quinasas forman una gran familia de proteínas que está relacionada con múltiples respuestas celulares. Dentro de este grupo de quinasas, cabe destacar por su papel en la activación y diferenciación de los linfocitos T al complejo formado por las isoformas ERK-1 y ERK-2. Tras la estimulación del TCR, se activa una ruta de transducción de señales que conduce a la fosforilación y activación de las enzimas MEK-1 y MEK-2, que a su vez fosforilan y activan a ERK-1/2 (esquema 4, introducción) [20].

Se analizó la cinética de fosforilación de ERK-1/2 en células T CD4⁺ control y *lpr* a lo largo de varias estimulaciones *in vitro*. Durante una estimulación primaria con conA + hrIL-2 no se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de fosforilación de ERK-1/2 entre las células T CD4⁺ control y *lpr* (Fig. 11A). Sin embargo, el análisis de la cinética de fosforilación de ERK-1/2 reveló una mayor activación de estas MAP-quinasas en las células T CD4⁺ deficientes en FAS durante una estimulación secundaria (Fig. 11B) y terciaria en los tiempos indicados (Fig. 11C).

Estos datos indican que la excesiva proliferación de las células T CD4⁺ *lpr* durante una estimulación repetida está asociada a una hiperactivación de ERK-1/2.

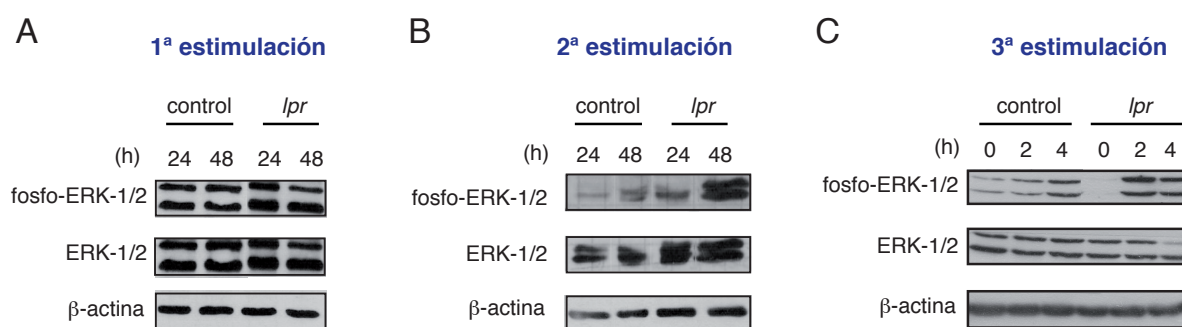


Figura 11. La activación de ERK-1/2 es regulada negativamente por FAS en células T CD4⁺ re-estimuladas

Western blot de la cinética de fosforilación de ERK-1/2 en células T CD4⁺ control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) en los tiempos indicados de una estimulación con conA (3 µg/ml) y hrIL-2 (20 ng/ml) primaria (A), secundaria (B) o terciaria (C). Se utilizó β-actina como control de carga. Experimento representativo de un total 2.

Para comprobar la relevancia funcional de la hiperactivación de ERK-1/2 detectada en las células T CD4⁺ *lpr* durante una 3ª estimulación, estas células se trataron con el inhibidor de la fosforilación de ERK-1/2 U0126 [106]. Este inhibidor ejerce su efecto supresor actuando específicamente sobre las quinasas de las MAP-quinasas (MKK) MEK-1/MEK-2 [106]. Tras añadir U0126, se produce una efectiva reducción en la fosforilación de ERK-1/2 en las células T CD4⁺ *lpr* estimuladas de manera repetida, quedando demostrada la eficiencia de este inhibidor (Fig. 12A). Durante una estimulación primaria con conA + hrIL-2, el tratamiento con U0126 provoca un significativo descenso en la incorporación de timidina tritiada, tanto en las células T CD4⁺ control como en las células *lpr* (control DMSO: 19.400 vs. control U0126: 3.090 cpm, *p*-valor = $1,26 \times 10^{-7}$ y *lpr* DMSO: 23.700 vs. *lpr* U0126: 4.300 cpm, *p*-valor = $5,27 \times 10^{-7}$) (Fig. 12B). Sorprendentemente, durante una 3ª estimulación el inhibidor U0126 provoca un descenso significativo únicamente en la proliferación de las células T CD4⁺ *lpr*, sin afectar a las células control (control DMSO: 11.430 vs. control U0126: 11.820 cpm, *p*-valor = 0,67 y *lpr* DMSO: 81.310 vs. *lpr* U0126: 34.320 cpm, *p*-valor = 0,0005) (Fig. 12C). Este efecto específico del inhibidor de ERK-1/2 en la proliferación de las células T CD4⁺ *lpr* re-estimuladas se corresponde con una disminución en los niveles de los marcadores

de activación CD25 y CD69 en estas mismas células tratadas con U0126, sin afectar a las células control (Fig. 12D).

Estos datos revelan que, la excesiva proliferación de las células T CD4⁺ deficientes en FAS durante una estimulación repetida depende de la activación de ERK-1/2.

En conjunto, estos resultados confirman un novedoso papel de FAS como regulador negativo de la activación y proliferación de las células T CD4⁺ estimuladas de manera repetida.

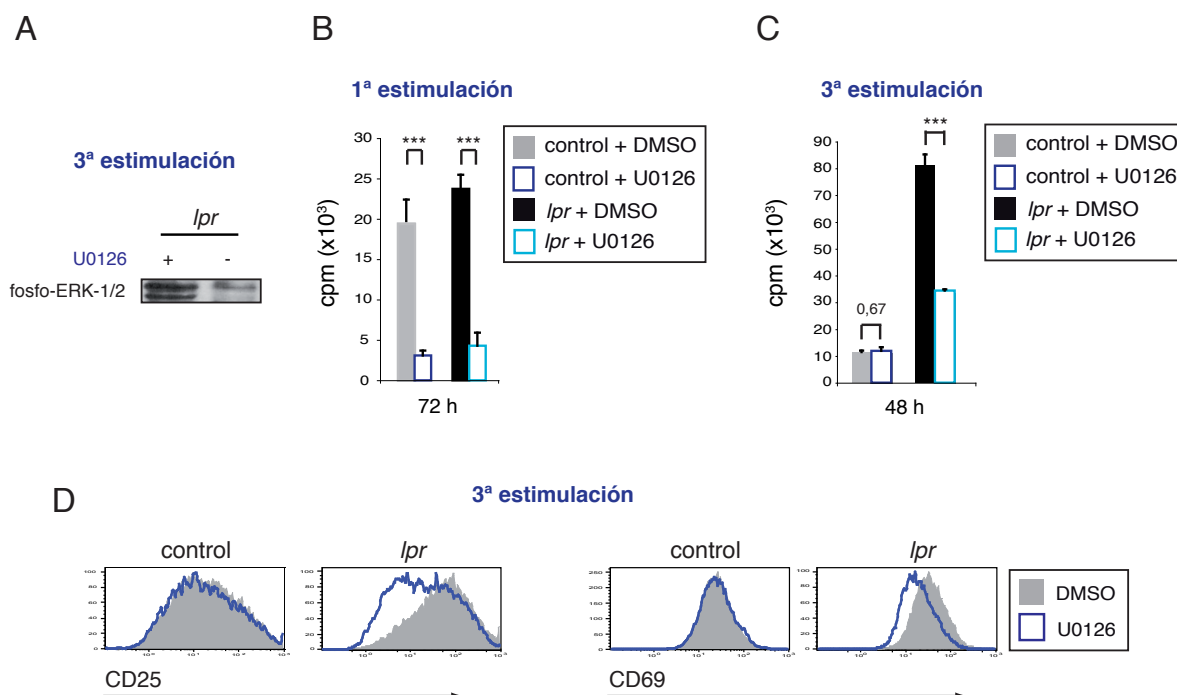


Figura 12. La hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr* durante una estimulación repetida depende de la activación de ERK-1/2

(A) Se muestra mediante *western blot* la inhibición de la fosforilación de ERK-1/2 con U0126 (10 μ M) en células T CD4⁺ *lpr* a las 4 h de una 3ª estimulación con conA (3 μ g/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml). Se ha representado la media y la desviación estándar de la incorporación de timidina tritiada en células T CD4⁺ control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) tratadas con U0126 (10 μ M) o DMSO a las 72 h de una primera estimulación con conA (3 μ g/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml) (B) y a las 48 h de una 3ª estimulación con conA (3 μ g/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml) (C). El *p*-valor (***) es menor a 0,001 y n=5 en ambos casos. (D) Expresión por CMF de CD25 y CD69 en células T CD4⁺ control y *lpr* a las 24 h de una 3ª estimulación con conA (3 μ g/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml) en presencia de U0126 (10 μ M) o DMSO. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes con resultados similares.

3.3. Relación entre las células T de memoria y la hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr*

A continuación, se estudió el fenotipo de las células T CD4⁺ durante las estimulaciones repetidas *in vitro*. Durante una segunda estimulación con conA + hr-IL2, se observó una acumulación progresiva de dos poblaciones diferenciadas de células de memoria en las células T CD4⁺ *lpr* (Fig. 13A). Estas poblaciones

se caracterizan por presentar altos niveles de CD44 y una expresión alta o baja de CD62L (esquema 2, introducción). Durante una tercera estimulación *in vitro*, la población de células T CD4⁺ de memoria/activadas (CD44^{alto}/CD62L⁺) se encuentra prácticamente ausente en las células control, mientras que en las células *lpr* esta población forma el 35 % del total de las células (Fig. 13B, panel izquierdo). Cabe destacar que, durante una 3^a estimulación las células T CD4⁺ *lpr* de memoria/activadas muestran una incorporación de BrdU *in vitro* dos veces mayor que la cuantificada en las células de memoria (CD44^{alto}/CD62L⁻) (Fig. 13B, panel derecho). Estos datos están en concordancia con los resultados *in vivo* mostrados anteriormente, donde las células de memoria/activadas de los ratones *lpr* muestran una mayor proliferación que la células de memoria (ver Fig. 3C).

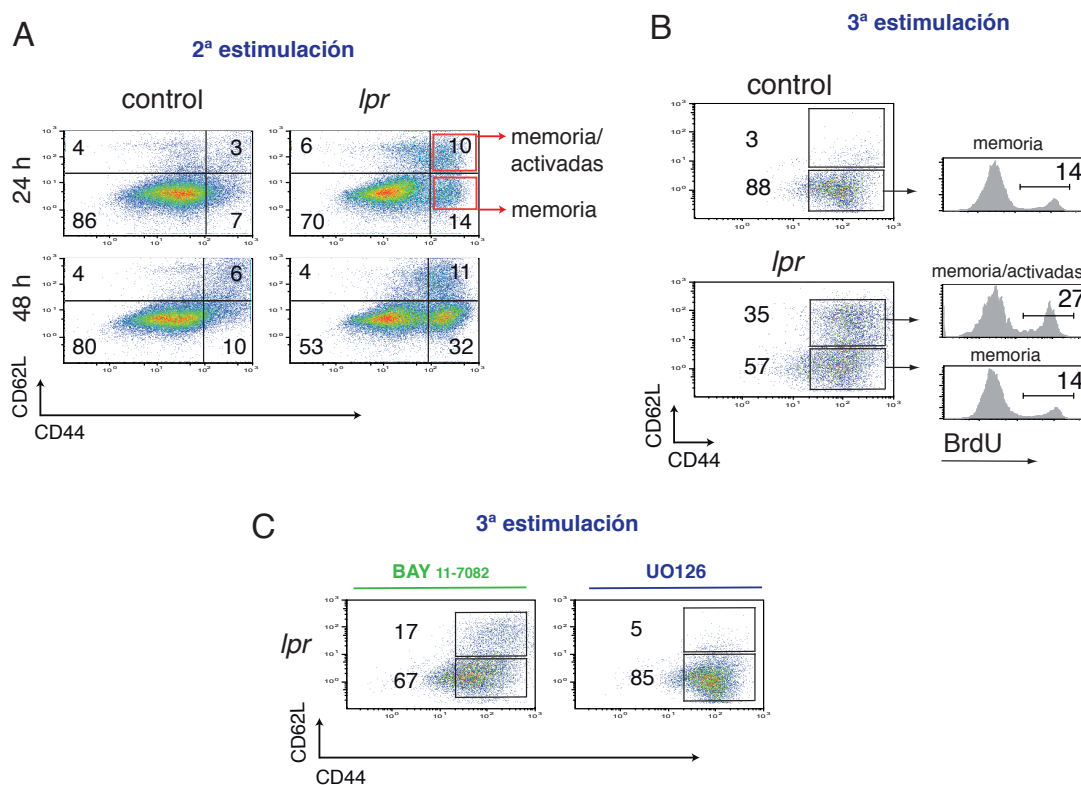


Figura 13. La acumulación de las células T CD4⁺ *lpr* de memoria/activadas hiperproliferativas depende de NF- κ B y ERK-

1/2

(A) Porcentaje de células T CD4⁺ CD44^{alto} y CD62L⁺ control y *lpr* a las 24 y 48 h de una 2^a estimulación con conA (3 μ g/ml) + hrIL-2 (20 ng/ml). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes con resultados similares. (B) Se muestran las 24 h de una 3^a estimulación con conA (3 μ g/ml) + hrIL-2 (20 ng/ml). En el panel izquierdo se enseñan los porcentajes de las poblaciones de células T CD4⁺ de memoria/activadas (CD44^{alto} y CD62L⁺) y de memoria (CD44^{alto} y CD62L⁻) control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*). En el panel derecho se enseñan los porcentajes de incorporación de BrdU (20 μ M) durante 3 h en estas dos poblaciones. Experimento representativo de un total de 3. (C) Se muestran los porcentajes de las poblaciones de células T CD4⁺ CD44^{alto} y CD62L⁺ *lpr* en presencia de BAY 11-7082 (5 μ M) o U0126 (10 μ M) a las 24 h de una 3^a estimulación con conA (3 μ g/ml) + hrIL-2 (20 ng/ml). Este experimento es representativo de un total de 2.

Previamente se ha expuesto la importancia de las rutas de NF- κ B y ERK-1/2 en la capacidad hiperproliferativa de las células T CD4⁺ deficientes en FAS. Por esta razón se analizó el efecto de la inhibición de ambas rutas en el desarrollo del fenotipo de memoria. El tratamiento con el inhibidor de la activación de NF- κ B (BAY 11-7082) o con el represor de la activación de ERK-1/2 (U0126), provoca una significativa disminución en los niveles de células T CD4⁺ de memoria/activadas *lpr*. El porcentaje de esta población pasó de un 35 % en las células T CD4⁺ *lpr* sin tratar (Fig. 13B), a un 17 % o un 5 % tras ser tratadas con BAY 11-7082 o U0126, respectivamente (Fig. 13C).

En conjunto, los datos descritos en este bloque indican que, durante una estimulación repetida en condiciones libres de apoptosis, la hiperproliferación de las células T CD4⁺ deficientes en FAS depende de la activación de ERK-1/2 y NF- κ B. Asimismo, se ha descrito una interesante acumulación de células T CD4⁺ *lpr* de memoria subordinada a la activación de NF- κ B y ERK-1/2 e independiente del papel de FAS en apoptosis. Estos hallazgos apuntan a que esta población celular podría ser la responsable de la hiperproliferación detectada en las células T *lpr*. Por lo tanto, estos resultados sugieren que FAS, además de inducir apoptosis, tiene un papel fundamental en el control de la activación y proliferación de las células T CD4⁺ de memoria.

4. Hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr* durante una estimulación repetida con antígenos específicos

Se ha demostrado que, en ausencia de FAS las células T CD4⁺ muestran un estado hiperactivo durante una re-estimulación *in vitro* con conA, que se relaciona con una mayor capacidad proliferativa de las mismas. A continuación, se analizó si existe asimismo una ventaja proliferativa de las células T CD4⁺ *lpr* bajo condiciones de activación fisiológicas, donde la estimulación se produce con un antígeno específico [122]. Para ello se utilizaron células T CD4⁺ que expresan un TCRtg específico para el antígeno citocromo c de paloma [103], obtenidas a partir de ratones deficientes en FAS (PCC.TCRtg-*lpr*) y de ratones control (PCC.TCRtg). Se puede identificar a estas células a través de la cadena beta (V β 3) y la cadena alpha (V α 11) de su TCRtg.

Además, el uso de estos ratones TCRtg permite utilizar antígenos de alta (PCC) o baja (A96I) afinidad para el TCR. Aprovechando la ventaja de este sistema, se examinó si las células T *lpr* presentan un umbral de activación a través de su TCR menor que las células control. Esta característica les haría más susceptibles a la estimulación frente a antígenos propios y a la pérdida de tolerancia. Por lo tanto, esta aproximación reproduce la respuesta de las células T CD4⁺ frente a antígenos propios, para los que el

TCR tiene una baja afinidad [123].

4.1. Ventaja proliferativa de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* re-estimuladas con antígenos específicos *in vitro*

Para simular *in vitro* una estimulación fisiológica con antígenos específicos, se han utilizado cultivos mixtos de células PCC.TCRtg o PCC.TCRtg-*lpr* junto con péptidos (PCC o A96I) presentados por APC previamente irradiadas.

4.1.1. Las células CD4⁺ TCRtg *lpr* y control tienen una proliferación similar durante una primera estimulación con antígenos específicos

Se estudió si la ausencia de FAS estaba involucrada en la respuesta de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* durante una estimulación primaria con APC + PCC (Fig. 14A). Se analizó únicamente la respuesta de las células *naïve* CD4⁺ TCRtg a antígenos de alta afinidad, porque la estimulación con antígenos de baja afinidad resultó ser demasiado débil como para obtener resultados significativos (datos no mostrados).

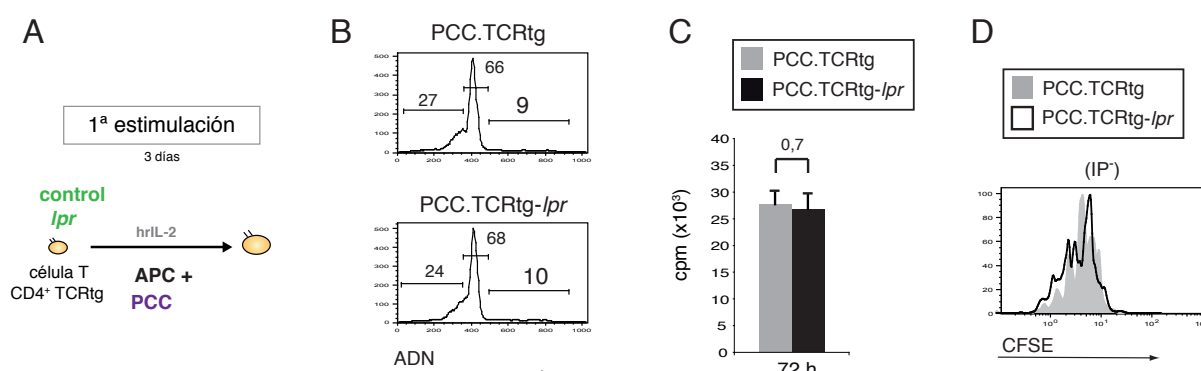


Figura 14. Proliferación similar entre las células CD4⁺ TCRtg control y *lpr* durante una 1ª estimulación con un antígeno específico *in vitro*

(A) Estimulación primaria *in vitro* en cultivos mixtos de células CD4⁺ TCRtg *naïve* control (PCC.TCRtg) y *lpr* (PCC.TCRtg-*lpr*) con APC irradiadas (B10BR, 30 grays) + PCC (3 μ M) + hr-IL2 (20 ng/ml). Se utilizaron 0,5x10⁶ células CD4⁺ TCRtg/ml y 2x10⁶ APC/ml. (B) Se muestra el porcentaje de células en las fases del ciclo celular muerte-apoptosis/G0-G1/S-G2-M (de izquierda a derecha) a las 72 h de una estimulación primaria en cultivos mixtos. Se enseña un experimento representativo de 3 independientes. (C) Incorporación de timidina tritiada a las 72 h de una estimulación primaria en cultivos mixtos. Los datos muestran la media y la desviación estándar. El *p*-valor es 0,7 (n=4). (D) Marcaje de CFSE en cultivos mixtos a las 72 h de una estimulación primaria. Las APC (CFSE-) y las células CD4⁺ TCRtg con señal positiva para el IP se han excluido del análisis. Este experimento es representativo de un total de 2 experimentos independientes.

El análisis del ciclo celular muestra unos porcentajes parecidos de células CD4⁺ PCC.TCRtg y

PCC.TCRtg-*lpr* en estado proliferativo (en las fases S-G2-M) (Fig. 14B). Los niveles de muerte son similares entre ambos tipos de células y se pueden atribuir mayoritariamente a la presencia de las APC que mueren varios días después de ser irradiadas. Además, la diferencia en los niveles de incorporación de timidina tritiada entre las células TCRtg control y deficientes en FAS no es significativa (PCC.TCRtg 27.650 y PCC.TCRtg-*lpr* 27.700, p -valor = 0,7) (Fig. 14C). Finalmente, se confirmó la ausencia de diferencias entre las células CD4⁺ TCRtg control y *lpr* durante una proliferación primaria mediante un ensayo de CFSE en el que ambas poblaciones mostraron una dilución similar de la sonda (Fig. 14D).

Por lo tanto, durante una primera estimulación *in vitro* con antígenos específicos para el TCR las células CD4⁺ TCRtg control y *lpr* muestran una respuesta proliferativa similar.

4.1.2. Ventaja proliferativa de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* durante una 2ª estimulación con un antígeno específico de baja afinidad

En un organismo una misma célula T auto-reactiva se encuentra con un auto-antígeno de manera repetida debido a su ubicuidad. Por lo tanto, se estimularon por segunda vez células CD4⁺ TCRtg control y *lpr* con APC capaces de presentar antígenos de dos afinidades diferentes para el TCR (PCC o A96I) (Fig. 15A). La estimulación con PCC produce una apoptosis inducida por activación que puede ser inhibida con z-VAD.

Durante una 2ª estimulación con péptidos específicos, el análisis del ciclo celular muestra como el péptido A96I no induce apoptosis y las células PCC.TCRtg-*lpr* muestran una mayor tasa proliferativa (% S-G2-M) que las células PCC.TCRtg (Fig. 15B, panel izquierdo). En el panel derecho de la Fig. 15B se observa como la re-estimulación con PCC provoca una fuerte inducción de apoptosis en las células PCC.TCRtg, que es directamente proporcional a la concentración del péptido. Para comparar la proliferación de las células TCRtg deficientes en FAS y control bajo estas condiciones de estimulación, se inhibió la inducción de apoptosis con z-VAD (50 μ M). El análisis de los datos obtenidos en presencia de z-VAD indica que las células PCC.TCRtg-*lpr* muestran una mayor tasa de proliferación (% S-G2-M) que las células PCC.TCRtg en una re-estimulación con PCC. Durante esta 2ª estimulación con PCC o A96I, la capacidad proliferativa de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* es mayor en respuesta a la concentración más baja del péptido, indicando un menor umbral de activación de las células deficientes en FAS.

Asimismo, se analizó la capacidad de síntesis de las células PCC.TCRtg-*lpr* mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada a las 24 h de una 2ª estimulación con PCC y A96I (1 y 10 μ M) en presencia de z-VAD (Fig. 15C). En concordancia con los datos anteriores, la estimulación con A96I induce una capacidad de síntesis 6,8 veces mayor en las células PCC.TCRtg-*lpr* respecto a las células control en respuesta a una concentración baja de péptido (1 μ M) y 3,6 veces mayor en respuesta a una concentración alta (10 μ M). Sin embargo, la estimulación con PCC no genera ninguna diferencia significativa en

la proliferación entre las células PCC.TCRtg y PCC.TCRtg-*lpr*.

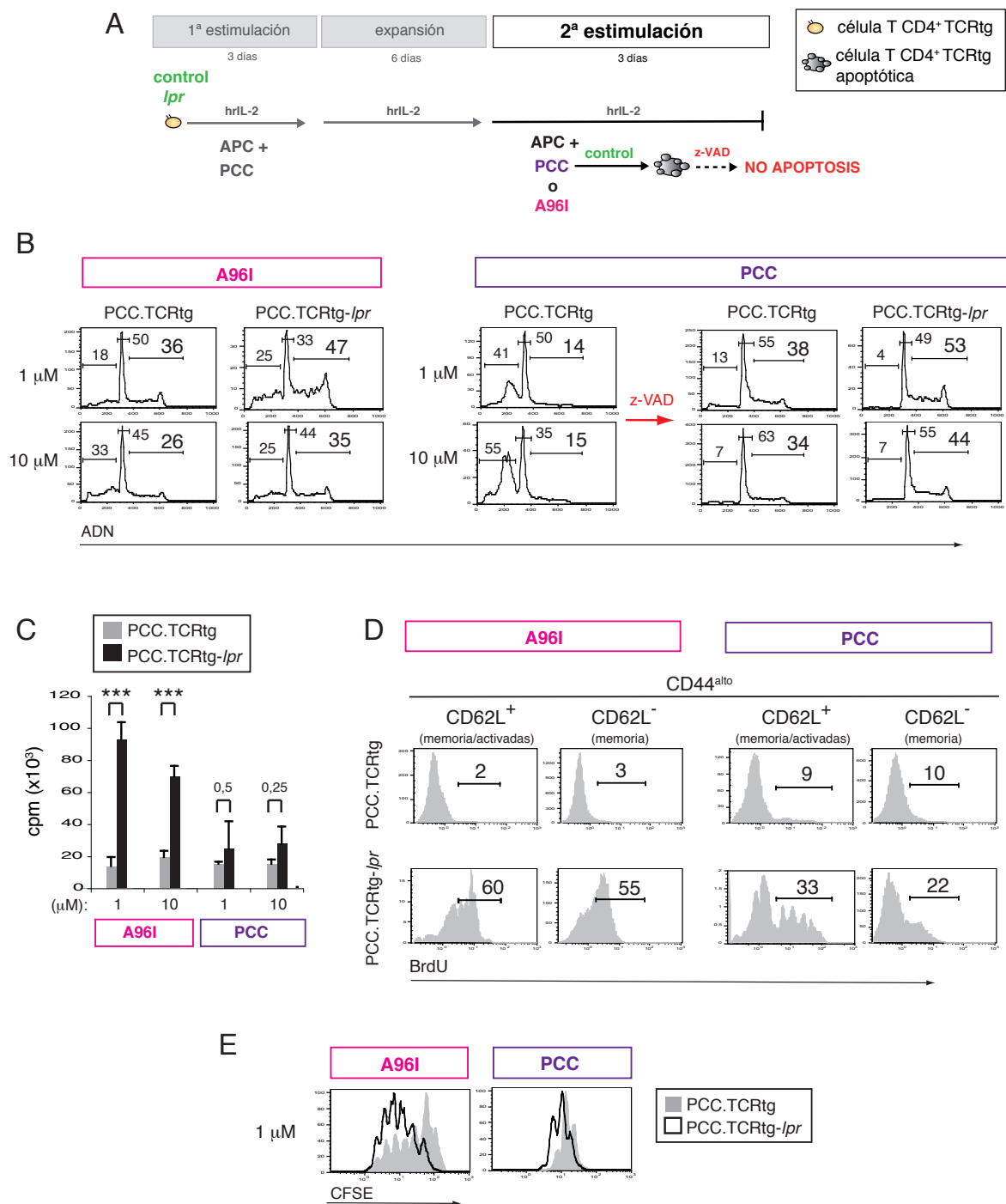


Figura 15. Ventaja proliferativa de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* durante una 2ª estimulación *in vitro* con un péptido de baja afinidad

(A) Estimulación secundaria *in vitro* en cultivos mixtos de células CD4⁺ TCRtg control (PCC.TCRtg) y *lpr* (PCC.TCRtg-*lpr*) en presencia de APC irradiadas (B10BR, 30 grays) + PCC o A96I (1-10 μ M) + hr-IL2. Se utilizaron 1×10^6 células CD4⁺ TCRtg/ml y 2×10^6 APC/ml. La apoptosis inducida por la estimulación con PCC se inhibió con z-VAD (50 μ M). (B) Se muestra el porcentaje de células CD4⁺ V β 3⁺ PCC.TCRtg y PCC.TCRtg-*lpr* en las fases de muerte-apoptosis/G0-G1/S-G2-M (de izquierda a derecha) a las 24 h de

una 2ª estimulación, realizada tal y como se indica en la Fig. 15A. En la parte derecha la apoptosis de las células control se inhibió con z-VAD 50 μ M. Se enseña un experimento representativo de 3 independientes. (C) Incorporación de timidina tritiada en células CD4⁺ PCC.TCRtg y PCC.TCRtg-*lpr* re-estimuladas como se indica en la Fig. 15A a las 24 h de una 2ª estimulación en presencia de z-VAD 50 μ M. Los datos muestran la media y la desviación estándar (n=5). El *p*-valor se ha indicado encima de las barras o bien se ha representado (***) cuando es menor de 0,001. (D) Incorporación de BrdU en las células CD4⁺ V β 3⁺ CD44^{alto} CD62L⁺ PCC.TCRtg y PCC.TCRtg-*lpr* re-estimuladas como se indica en la Fig. 15A con PCC o A96I 1 μ M a las 24 h de una 2ª estimulación en presencia de z-VAD 50 μ M. Se muestra un experimento representativo de 2. (E) Señal de CFSE en las células CD4⁺ V β 3⁺ PCC.TCRtg y PCC.TCRtg-*lpr* re-estimuladas como se indica en la Fig. 15A con PCC o A96I 1 μ M a las 72 h de una estimulación secundaria. Se muestran las células IP negativas. Este experimento es representativo de un total de 3 independientes.

Se confirmó la elevada capacidad de síntesis de las células PCC.TCRtg-*lpr* mediante un ensayo de incorporación de BrdU realizado a las 24 h de una 2ª estimulación con A96I o PCC (1 μ M) en presencia de z-VAD (50 μ M). Este ensayo se ha analizado en las dos poblaciones de células T CD4⁺ CD44^{alto} (CD62L⁺ o memoria/activadas y CD62L⁻ o memoria). Se detectó una elevada incorporación de BrdU en las células CD4⁺ CD44^{alto} TCRtg-*lpr* tras una re-estimulación con PCC débil, llegando a alcanzar niveles hasta 30 veces superiores a los detectados en las células control (Fig. 15D, panel izquierdo). Por otro lado, la respuesta al péptido PCC generó unos niveles de incorporación de BrdU 3 veces mayores en las células CD4⁺ TCRtg-*lpr* de memoria/activadas respecto a las células control y 2 veces superiores en las células CD4⁺ TCRtg-*lpr* de memoria (Fig. 15D, panel derecho). En concordancia con resultados anteriores (Fig. 3C, 13B), estos datos confirman que la capacidad de síntesis de las células de memoria/activadas CD4⁺ TCRtg-*lpr* es superior a la detectada en las células de memoria CD4⁺ TCRtg-*lpr*.

Bajo estas mismas condiciones de estimulación, las células CD4⁺ PCC.TCRtg-*lpr* muestran una mayor capacidad de división respecto a las células control. En respuesta a una concentración baja de A96I (1 μ M), las células CD4⁺ TCRtg-*lpr* muestran una mayor dilución de la sonda de CFSE respecto a las células control; mientras que esta diferencia es mínima cuando las células son estimuladas con PCC (1 μ M) (Fig. 15E).

La hiperproliferación de las células PCC.TCRtg-*lpr* en respuesta a un péptido específico de baja afinidad para el TCR indica que estas células presentan un umbral de activación bajo. Esta característica haría a las células T CD4⁺ *lpr* más susceptibles a la respuesta frente a antígenos propios y, consecuentemente, a la pérdida de tolerancia.

Además, estos hallazgos revelan de nuevo una importante ventaja proliferativa en la población de células T CD4⁺ *lpr* de memoria/activadas (CD44^{alto} y CD62L⁺).

4.1.3. Hiperproliferación de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* en una re-estimulación sin inducción de apoptosis

Asimismo, se ha estudiado la respuesta proliferativa de las células CD4⁺ TCRtg durante una 3^a estimulación *in vitro* con un péptido específico de baja afinidad (Fig. 16A). Al igual que ocurre en los ensayos realizados durante una 3^a estimulación con conA (Fig. 6), aquí tampoco hay activación de la ruta apoptótica. Bajo estas condiciones libres de apoptosis, se detectó un evidente incremento en la capacidad proliferativa de las células CD4⁺ PCC.TCRtg-*lpr* re-estimuladas con A96I (PCC.TCRtg 21 vs. PCC.TCRtg-*lpr* 35 % células en las fases S-G2-M) (Fig. 16B). Asimismo, el ensayo de incorporación de timidina tritiada muestra una ventaja significativa en la capacidad de síntesis de las células CD4⁺ TCRtg-*lpr* en respuesta a una baja concentración de A96I (PCC.TCRtg 4.100 vs. PCC.TCRtg-*lpr* 9.900 cpm, *p*-valor=0,0006).

Estos resultados revelan un papel de FAS independiente de la apoptosis, como regulador negativo de la proliferación de las células CD4⁺ TCRtg en respuesta a un péptido específico de baja afinidad para el TCR presentado de manera repetida.

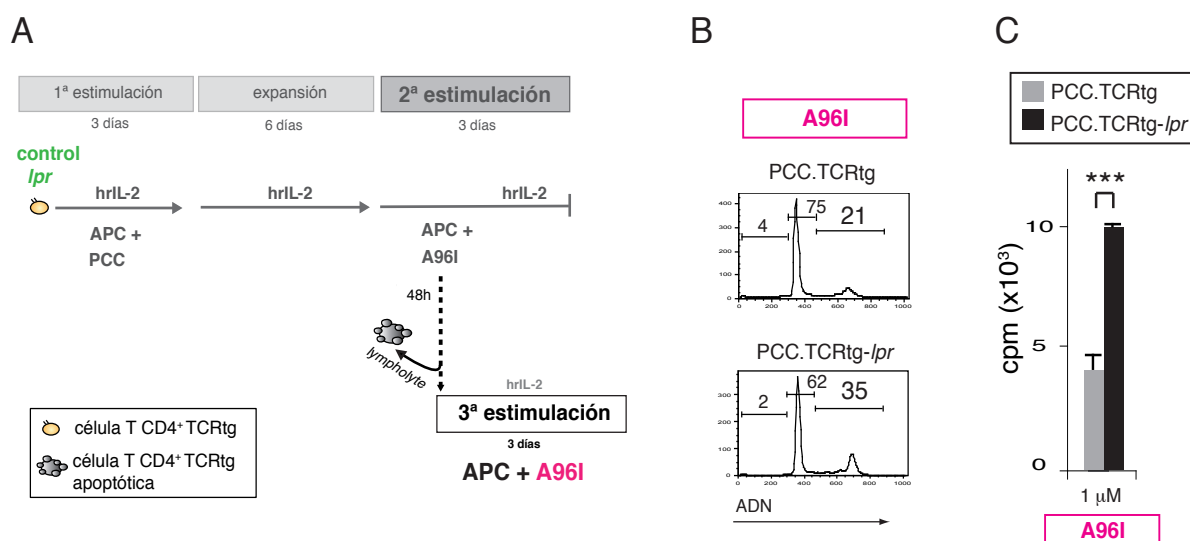


Figura 16. Las células CD4⁺ TCRtg-*lpr* hiperproliferan en una re-estimulación con un péptido de baja afinidad en ausencia de apoptosis

(A) Las células CD4⁺ TCRtg control (PCC.TCRtg) y *lpr* (PCC.TCRtg-*lpr*) muertas procedentes de la 2^a estimulación se eliminaron por centrifugación por gradiente de densidad y se estimularon por 3^a vez *in vitro* con APC irradiadas (B10BR, 30 grays) + A96I (1 μM) + hr-IL2 en condiciones libres de apoptosis. Se utilizaron 1x10⁶ células CD4⁺ TCRtg/ml y 2x10⁶ APC/ml. (B) Se muestra el porcentaje de células Vβ3⁺ CD4⁺ PCC.TCRtg y PCC.TCRtg-*lpr* en las fases de muerte-apoptosis/G0-G1/S-G2-M (de izquierda a derecha) a las 24 h de una 3^a estimulación con APC + A96I (1 μM) + hr-IL2, estimuladas tal y como se describe en la Fig. 16A. Se enseña un experimento representativo de 3 independientes. (C) Cuentas por minuto de incorporación de timidina tritiada en células CD4⁺ PCC.TCRtg y PCC.TCRtg-*lpr* a las 24 h de una 3^a estimulación con APC + A96I (1 μM) + hr-IL2. Los datos muestran la media y la desviación estándar (n=4). El *p*-valor (***) es menor a 0,001.

4.1.4. La hiperproliferación de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* re-estimuladas con un péptido de baja afinidad depende de NF-κB

En resultados anteriores se ha demostrado un importante papel de la ruta de NF-κB en la proliferación de las células T CD4⁺ deficientes en FAS (Fig. 8 y Fig. 10). Por lo tanto, se estudió si esta ruta también está relacionada con la hiperproliferación detectada en las células CD4⁺ TCRtg durante una re-estimulación con un antígeno específico de baja afinidad. Para ello, se utilizó el inhibidor de la activación de NF-κB, BAY 11-7082, durante una 2ª estimulación con el péptido A96I. A pesar de que este inhibidor no afecta de manera significativa a la proliferación de las células PCC.TCRtg (DMSO: 13.100 vs. BAY 11-7082: 9.000 cpm, *p*-valor = 0,38), provoca una drástica disminución en la elevada capacidad de síntesis de las células PCC.TCRtg-*lpr* (DMSO: 92.500 vs. BAY 11-7082: 980 cpm, *p*-valor = 0,0001).

Estos resultados sugieren que la hiperproliferación de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* durante una estimulación repetida con un péptido de baja afinidad depende de la activación de NF-κB.

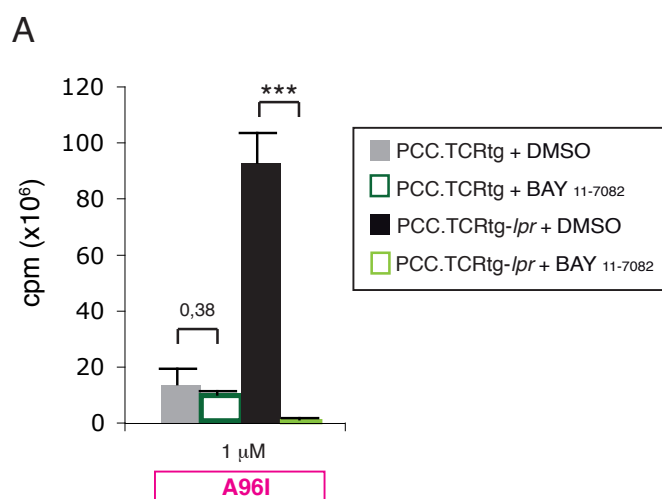


Figura 17. La hiperproliferación de las células CD4⁺ TCRtg re-estimuladas con un péptido de baja afinidad depende de NF-κB

(A) Incorporación de timidina tritiada en células CD4⁺ PCC.TCRtg y PCC.TCRtg-*lpr* a las 24 h de una 2ª estimulación con APC + A96I (1 μM) + hr-IL2 en presencia de z-VAD 50 μM, bajo las condiciones descritas en la Fig. 15A. Los datos muestran la media y la desviación estándar (n=5). El *p*-valor (***) es < 0,001.

4.2. Ventaja proliferativa de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* re-estimuladas *in vivo*

Las interacciones que se producen durante una respuesta a un antígeno entre los linfocitos y el resto de componentes del sistema inmune son complejas y tienen lugar en los órganos linfoides secundarios. Por lo tanto, los estudios realizados *in vitro* podrían no representar el comportamiento real de las células T. A continuación, se analizó si la ventaja proliferativa detectada en las células TCRtg-*lpr* en respuesta a un péptido de baja afinidad reflejaba el comportamiento de estas células en una situación *in vivo*.

En un organismo existe una frecuencia muy baja de células con un TCR determinado, lo que dificulta la detección de poblaciones específicas de linfocitos T *in vivo* [124]. Mediante técnicas de transferencia

adoptiva de pueden introducir células con un TCR transgénico específico en ratones receptores y su frecuencia (0,5-1% de las células en los órganos linfoides secundarios) es suficientemente alta para poder detectarlas y estudiar su comportamiento *in vivo* [122, 124]. Dadas las ventajas de este sistema, se transfirieron células CD4⁺ TCRtg deficientes en FAS y control en ratones receptores para estudiar su comportamiento proliferativo después de un protocolo de estimulaciones repetidas *in vivo*. Las células transferidas pueden ser reconocidas mediante marcadores específicos para su TCR, en este caso V β 3.

4.2.1. Ausencia de apoptosis en células CD4⁺ TCRtg re-estimuladas *in vivo*

Para obtener una respuesta inmune efectiva ante un antígeno es necesario generar un ambiente inflamatorio. Para ello, se han utilizado adyuvantes, como el sistema CFA-IFA, que inducen mediadores de inflamación capaces de influir en la respuesta de las células T [125]. El uso de adyuvantes genera una situación de inflamación aguda en la que el antígeno persiste en el ratón receptor durante un largo período de tiempo. De forma alternativa, se han utilizado APC especializadas, como las células dendríticas maduras, para generar una respuesta más específica. Estas DC se pueden cargar con un antígeno específico y, tras ser inyectadas en el ratón recipiente, se dirigen hacia los órganos linfoides secundarios donde presentan el antígeno a linfocitos T específicos y mueren alrededor de 3 días más tarde.

Para estudiar el comportamiento de las células TCRtg en un protocolo de estimulaciones consecutivas *in vivo*, se aislaron células CD4⁺ (V β 3⁺) de ratones deficientes en FAS (PCC.TCRtg-*lpr*) y control (PCC.TCRtg) y se inyectaron en ratones receptores B10BR. Un día después, los ratones receptores fueron estimulados con CFA + PCC o DC + PCC. Transcurridas 3 semanas, estos ratones se estimularon de nuevo con IFA + PCC/A96I o con DC + PCC/A96I. Cinco días después de la 2^a estimulación *in vivo*, se extrajeron los bazo de los ratones receptores, se disgregaron y esta suspensión celular se volvió a estimular *ex vivo* con PCC o A96I para estudiar la proliferación de las células inicialmente transferidas (CD4⁺ V β 3⁺) (esquema 13, materiales y métodos).

Durante una estimulación repetida *in vivo*, podrían generarse diferencias en la susceptibilidad apoptótica de las células CD4⁺ TCRtg control y *lpr*, que afectarían a la interpretación de los datos. Los resultados anteriores demuestran que, en una 3^a estimulación *in vitro* no se induce la ruta apoptótica en las células T CD4⁺ (ver Fig. 6 y Fig.16). Por esta razón, se centró el estudio de la proliferación de las células transferidas en una 3^a estimulación *ex vivo*, en la que se puede comprobar experimentalmente si hay inducción de apoptosis. Tal y como se esperaba, no se detectó ninguna inducción de apoptosis durante una 3^a estimulación *ex vivo*. Este hecho fue comprobado mediante el análisis del ciclo celular en la población CD4⁺ V β 3⁺ a las 24 h de una 3^a estimulación *ex vivo* con PCC o A96I, que revela únicamente un porcentaje moderado de muerte basal (Fig. 18A). Previamente, estas células habían sido estimuladas dos veces *in vivo* con DC + PCC/A96I. Se corroboró la ausencia de apoptosis bajo

estas mismas condiciones de estimulación mediante una tinción con anexina-V + IP a las 24 h de una 3ª estimulación *ex vivo* con PCC o A96I (Fig. 18B). Aquí, los porcentajes de células CD4⁺ Vβ3⁺ apoptóticas (anexina-V⁺ IP⁻) detectados fueron muy bajos y similares en ratones transferidos con células control o *lpr*. Se obtuvieron resultados equivalentes a los mostrados en las Figuras 18B y 18C en otros experimentos donde las estimulaciones *in vivo* se realizaron con adyuvante (CFA/IFA) + péptido (datos no mostrados).

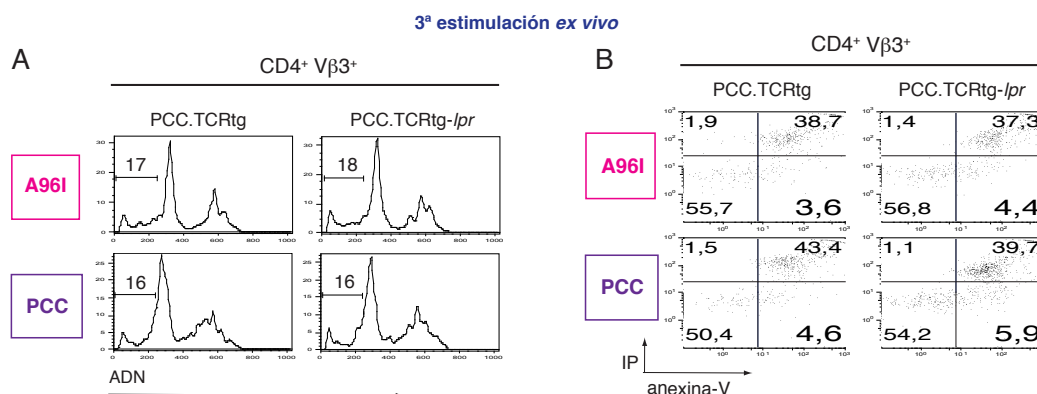


Figura 18. Ausencia de apoptosis durante una 3ª estimulación *ex vivo*

(A) Tinción de ciclo celular en las células CD4⁺ Vβ3⁺ a las 24 h de una 3ª estimulación *ex-vivo* con PCC o A96I (1 μM) (5x10⁶ de células/ml). Estas células se obtuvieron a partir de bazo de ratones receptores B10BR en los que previamente se habían transferido células CD4⁺ TCRtg (Vβ3⁺) control o *lpr*. Estos ratones receptores fueron estimulados *in vivo* dos veces consecutivas con DC cargadas con PCC o A96I, tal y como se indica en el esquema 13 (materiales y métodos). Se muestra un experimento representativo de un total de 5. (B) Tinción de Anexina-V-FITC + IP en las células CD4⁺ Vβ3⁺ 24 h después de una 3ª estimulación *ex-vivo* con PCC o A96I (1 μM) (5 x10⁶ de células/ml). Estas células se obtuvieron y se estimularon de la misma manera que en la figura 18 A. Se muestra un experimento representativo de un total de 2 independientes, n=4,

Estos datos indican que una 3ª estimulación *ex vivo*, realizada después de dos estimulaciones consecutivas *in vivo*, no genera diferencias apoptóticas entre las células CD4⁺ TCRtg control y *lpr*.

4.2.2. Hiperproliferación de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* tras una estimulación repetida *in vivo*

No se han encontrado diferencias significativas en el porcentaje de células CD4⁺ Vβ3⁺ control y *lpr* en los órganos linfoides secundarios de los ratones receptores al final de una 2ª estimulación *in vivo* (dato no mostrado). Asimismo, este protocolo de estimulaciones seriadas *in vivo* no genera diferencias en los niveles de apoptosis detectados en las células CD4⁺ TCRtg control y *lpr* durante una 3ª estimulación *ex vivo* (Fig. 18). Por lo tanto, se puede asumir que la representación de las células CD4⁺ TCRtg control y *lpr* en los órganos linfoides secundarios es similar. Por consiguiente, se utilizó este sistema para comprobar si la excesiva proliferación detectada en las células T *lpr in vitro* (ver Fig. 5, 6, y apartado 4.1. de resultados) también ocurre bajo condiciones fisiológicas de re-estimulación con un antígeno específico.

Siguiendo el protocolo descrito en el esquema 13 (materiales y métodos), después de una 2ª estimu-

lación *in vivo* con PCC o A96I administrado junto con adyuvante o con DC, se detectaron unos niveles de CD44 más elevados en las células de bazo CD4⁺ Vβ3⁺ deficientes en FAS que en las células control (Fig. 19A). Estos datos apuntan a una mayor acumulación de células de memoria TCRtg *lpr* bajo estas condiciones de estimulación.

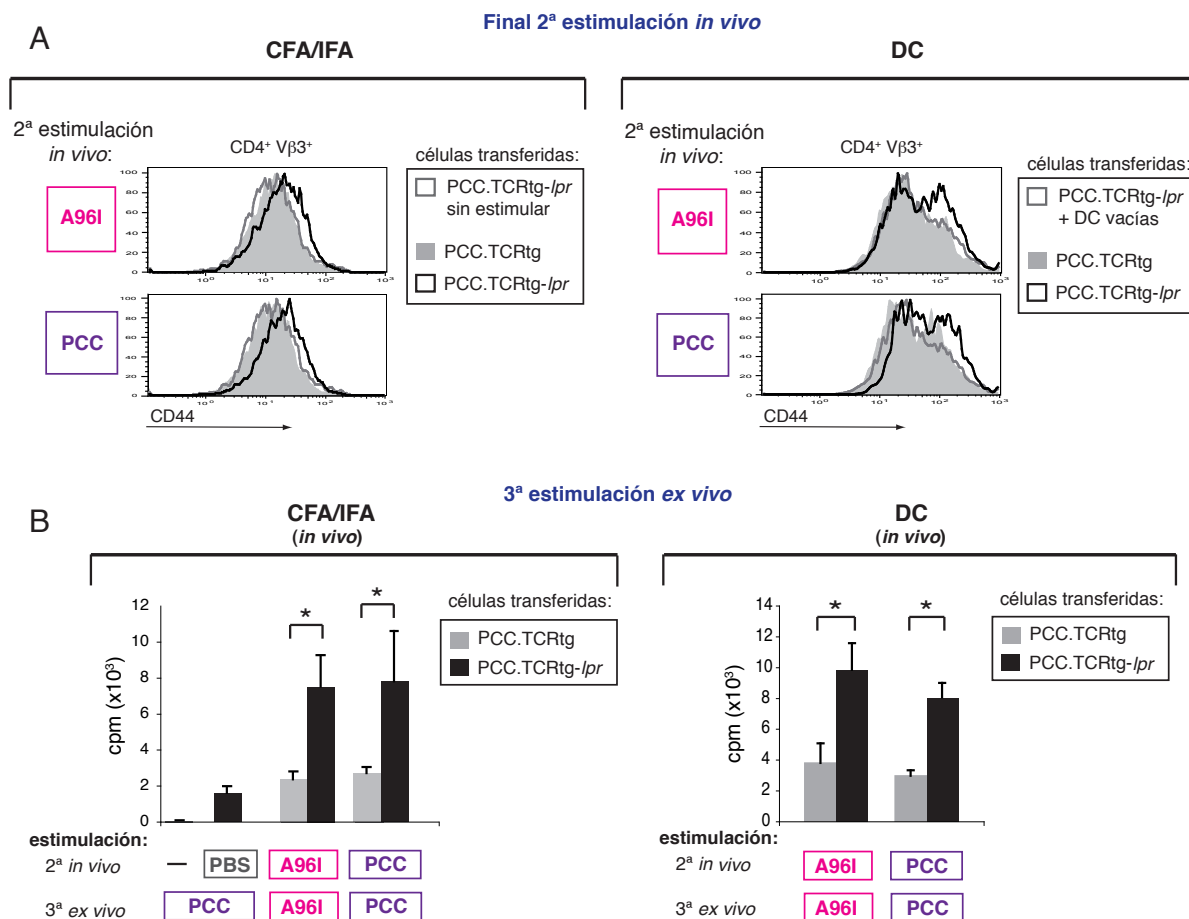


Figura 19. Hiperproliferación de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* después de una estimulación repetida *in vivo*

(A) Siguiendo el protocolo descrito en el esquema 13 (materiales y métodos), 5 días después de la 2ª estimulación *in vivo* con PCC/A96I + adyuvante o DC, se aislaron los bazos de los ratones recipientes y se analizaron los niveles de CD44 en las células CD4⁺ Vβ3⁺. Como controles (color gris sin relleno) se utilizaron ratones receptores de células PCC.TCRtg-*lpr* sin estimular (panel izquierdo) o estimulados con DC vacías (sin PCC) (panel derecho). Se muestra un experimento representativo, n=6. (B) Siguiendo el protocolo del esquema 13 (materiales y métodos), 5 días después de la 2ª estimulación *in vivo* con PCC/A96I + adyuvante o DC, se aislaron los bazos de los ratones receptores y se midió la incorporación de timidina tritiada a las 24 h (CFA) o a las 48 h (DC) de la 3ª estimulación *ex vivo* con PCC o A96I (1 μM) (5 x10⁶ de células/ml). Como controles se utilizaron ratones receptores de células PCC.TCRtg-*lpr* sin estimular *in vivo* (color gris sin relleno, panel izquierdo), o estimulados con adyuvante + PBS 1X *in vivo* (color gris oscuro, panel izquierdo). El *p*-valor es en todos los casos < 0,05 (CFA/IFA: A96I *p*-valor = 0,05; PCC: *p*-valor = 0,03) (DC: A96I *p*-valor = 0,019; PCC: *p*-valor = 0,035), n = 8 por condición.

Finalmente, se realizó un ensayo de incorporación de timidina tritiada durante una 3ª estimulación *ex*

vivo en células de bazo de ratones estimuladas tal y como se detalla en el esquema 13 (materiales y métodos) (Fig. 19B). Durante esta 3ª re-estimulación *ex vivo* con A96I o PCC, se detectó una mayor capacidad de síntesis en los ratones transferidos con células CD4⁺ TCRtg *lpr* vs. control (*p*-valor < 0,05). Cabe mencionar que la incorporación de timidina tritiada en las células de ratones previamente estimulados *in vivo* con CFA/IFA + péptido es mayor que en el caso de los ratones estimulados con CFA/IFA + PBS 1X o que los ratones B10BR no tratados (Fig. 19B, panel izquierdo). Este hecho indica que la ventaja proliferativa detectada en los ratones transferidos con células TCRtg *lpr* se debe a una respuesta específica de las células CD4⁺ Vβ3⁺ al péptido A96I o PCC.

Estos datos confirman que las células deficientes en FAS muestran un incremento en el fenotipo de memoria y una mayor proliferación después de una 2ª estimulación *in vivo* con péptidos específicos.

5. Papel de p21 en el desarrollo de autoinmunidad de los ratones *lpr*

p21, además de su conocido papel como regulador negativo del ciclo celular, ejerce una novedosa función como supresor de autoinmunidad contribuyendo al mantenimiento de la tolerancia. Las hembras p21^{-/-} presentan claras manifestaciones autoinmunes y desarrollan un fenotipo similar al lupus, como consecuencia de la proliferación incontrolada de las células T CD4⁺ de memoria/efectoras [36, 37].

En esta Tesis se ha demostrado que, tanto *in vitro* como *in vivo*, FAS tiene una nueva función como regulador negativo de la activación y proliferación de las células T de memoria, independiente de la apoptosis. Este papel de FAS está relacionado con la respuesta a antígenos que presentan una baja afinidad para el TCR, al igual que la mayoría de los auto-antígenos. Dado el importante papel de p21 y de FAS en el control de la respuesta proliferativa de las células T, se estudió el efecto de la sobre-expresión o de la ausencia de p21 en el desarrollo del fenotipo autoinmune los ratones *lpr*.

5.1. La sobre-expresión de p21 en células T *lpr* disminuye su proliferación y el desarrollo de autoinmunidad

Dado que p21 actúa como un regulador negativo de la proliferación de las células T, se utilizó esta molécula como herramienta para inhibir la hiperproliferación de las células T *lpr*. Para ello, se generaron ratones C57BL/6-*lpr*-p21tg (en adelante, *lpr*-p21tg) que expresan de manera constitutiva el gen del p21 humano bajo el promotor de Ick, por lo que su expresión está restringida a las células T [101]. Estos animales se obtuvieron cruzando ratones C57BL/6-p21tg (en adelante, p21tg) y C57BL/6-*lpr* (*lpr*). Los ratones p21tg no muestran alteraciones en el desarrollo ni en la diferenciación de las células T [101]. En este apartado los ratones C57BL/6 se identificarán como “control”.

Además, se utilizaron ratones MRL-*mp*, MRL-*lpr* y MRL-*lpr*-p21tg para estudiar el efecto de la sobre-expresión de p21 en un fondo genético pro-autoinmune que acelera la enfermedad y la muerte de los ratones deficientes en FAS.

La sobre-expresión de p21 en las células T, permite estudiar la relación entre la excesiva activación/proliferación de las células T *lpr* y el desarrollo de linfadenopatía y de la enfermedad autoinmune en los ratones deficientes en FAS.

5.1.1. La hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr* *in vitro* disminuye al expresar el transgén de p21

Para corroborar que p21 realmente ejerce un control negativo en la proliferación de las células T *lpr* de memoria, se analizó el efecto de la expresión del transgén de esta molécula durante una estimulación secundaria *in vitro*.

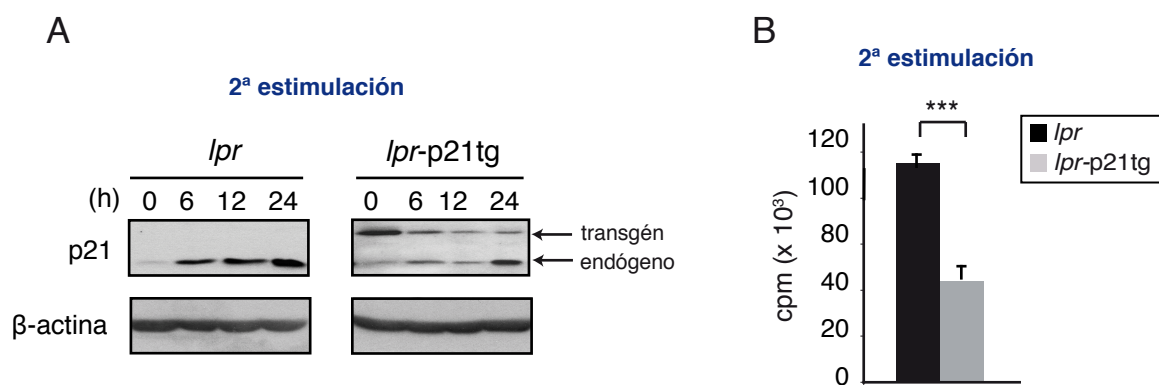


Figura 20. El transgén de p21 disminuye la proliferación de las células T CD4⁺ *lpr* durante una 2^a estimulación *in vitro*.

(A) Western blot de p21 realizado en células T CD4⁺ *lpr* (C57BL/6-*lpr*) y *lpr*-p21tg (C57BL/6-*lpr*-p21tg) en los tiempos indicados de una 2^a estimulación con conA (3 μ g/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml). Se indican los niveles de p21 endógeno y del transgén de p21 humano expresado en células T bajo el promotor proximal Ick. Se utilizó β -actina como control de carga. Experimento representativo de un total de 2. (B) Incorporación de timidina tritiada en células T CD4⁺ *lpr* y *lpr*-p21tg a las 48 h de una 2^a estimulación. Los datos muestran la media y la desviación estándar (n=4). El p-valor (***) es menor de 0,001.

De este modo, primero se comprobó la expresión del transgén en las células T CD4⁺ *lpr*-p21tg. Para ello, se analizaron por western blot los niveles del p21 endógeno y del transgén en células T CD4⁺ *lpr* y *lpr*-p21tg durante una 2^a estimulación *in vitro* (Fig. 20A). En este caso, no es necesario añadir z-VAD debido a la ausencia de FAS. Al final del período de expansión con IL-2 (0 h) se detectaron unos niveles mínimos de p21 endógeno en las células T *lpr* y *lpr*-p21tg, mientras que la expresión del transgén resultó ser muy alta en las células T *lpr*-p21tg. Tras una 2^a estimulación, los niveles de p21 endógeno aumentaron significativamente en las células T *lpr*, sugiriendo que p21 tiene un papel crítico en el control de la proliferación de las células T re-estimuladas. En las células T *lpr*-p21tg se observó una reducción en

la expresión del transgén de p21 tras una estimulación secundaria, indicando que los altos niveles del transgén detectados antes de la re-estimulación podrían condicionar a estas células para disminuir su capacidad proliferativa. Se confirmó esta propuesta mediante un análisis de la incorporación de timidina tritiada a las 48 h de una 2ª estimulación, en el que la capacidad de síntesis de las células T *lpr*-p21tg (41×10^3 cpm) resultó ser significativamente menor que la detectada en las células T *lpr* (107×10^3 cpm) (Fig. 20B)

Por lo tanto, la expresión del transgén de p21 disminuye de forma significativa la elevada capacidad proliferativa de las células T CD4⁺ *lpr* durante una 2ª estimulación *in vitro*.

5.1.2. Los niveles altos de p21 inhiben la activación y proliferación de las células T DN en los ratones *lpr*

La linfadenopatía es un rasgo característico del fenotipo manifestado por los ratones deficientes en FAS (Fig. 1B). Como se ha descrito anteriormente, los ratones *lpr* presentan una excesiva proliferación de las células T DN (B220⁺TCR β ⁺CD4⁺CD8⁻) que es responsable, en parte, del excesivo tamaño de los órganos linfoides secundarios de estos ratones (Fig. 2B). Estas células T DN se originan a partir de las células T CD8⁺ [114, 115].

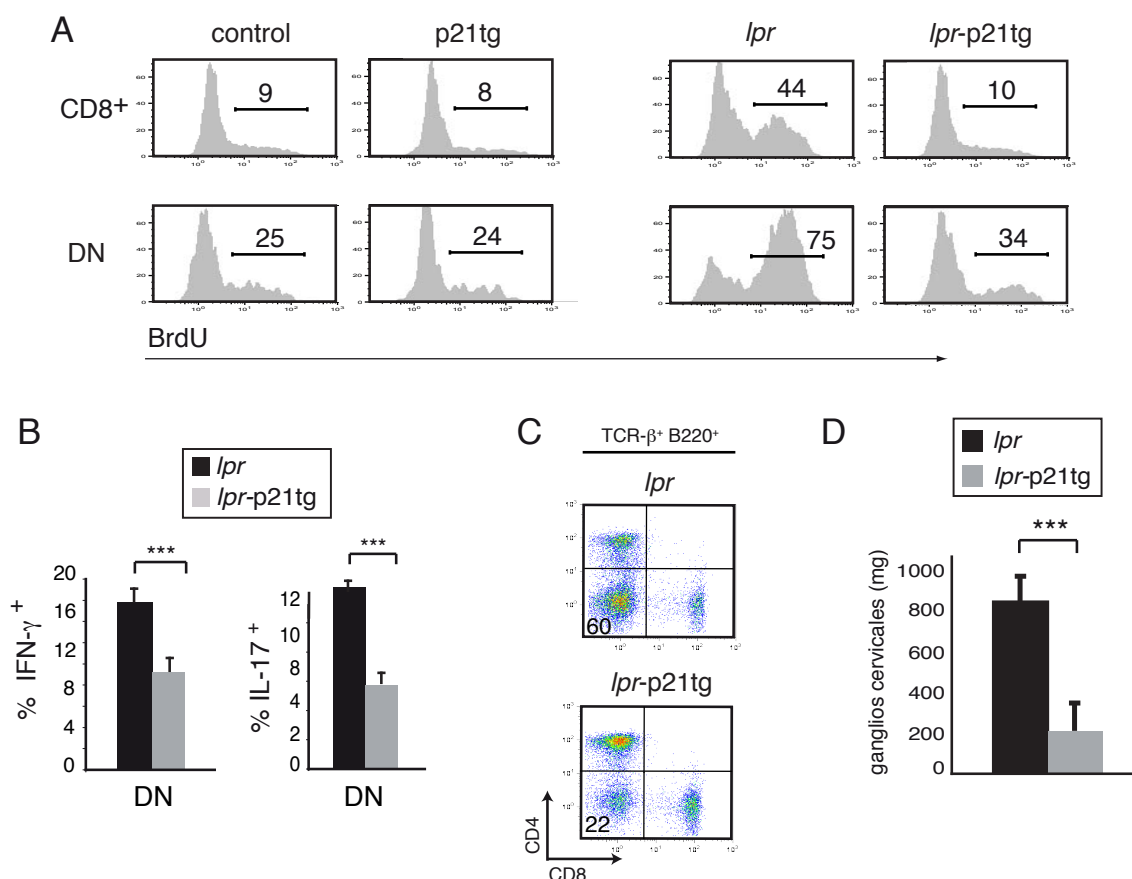


Figura 21 . Reducción de la activación y proliferación de las células T DN en los ratones *lpr*-p21tg vs. *lpr*

(A) Incorporación de BrdU *in vivo* en las células T CD8⁺ y DN (B220⁺TCRβ⁺CD4⁺CD8⁺) de los nódulos linfáticos cervicales de ratones control (C57BL/6), p21tg, *lpr* y *lpr*-p21tg de 2 meses de edad (todos ellos en fondo C57BL/6). Los ratones bebieron BrdU (0,8 mg/ml) durante 9 días consecutivos. Se muestra un experimento representativo de 2 (n=6). (B) Tinción intracelular de las citoquinas IFN-γ e IL-17 en células de bazo de ratones *lpr* y p21tg-*lpr* de 4 meses de edad estimuladas con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (2 μg/ml). Se muestra esta tinción en las células T DN. Los datos se han representado como la media + la desviación estándar (n = 6). El *p*-valor (***) es menor a 0,001. (C) Porcentaje de células T DN en nódulos linfáticos de ratones *lpr* y p21tg-*lpr* de 5 meses de edad. Se muestra un experimento representativo (n=4). (D) Peso de los ganglios linfáticos cervicales de hembras *lpr* y p21tg-*lpr* de 8 meses de edad representado como el valor medio y la desviación estándar n=10). El *p*-valor (***) es menor a 0,001.

La expresión del transgén de p21 en los ratones control no tiene ningún efecto significativo en la proliferación *in vivo* de las células T CD8⁺ y DN (Fig. 21A, panel izquierdo). Sin embargo, la sobre-expresión de p21 reduce notablemente la hiperproliferación de las células T CD8⁺ y DN en los ratones deficientes en FAS (*lpr*: 44 vs. *lpr*-p21tg: 10 % incorporación de BrdU en las células T CD8⁺ y *lpr*: 75 % vs. *lpr*-p21tg: 34 % incorporación de BrdU en las células T DN) (Fig. 21A, panel derecho). Además, la sobre-expresión de p21 disminuye la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IFN-γ e IL-17 en las células T DN deficientes en FAS (*lpr* 17,5 vs. *lpr*-p21tg 11 % células T DN IFN-γ⁺ y *lpr* 13 vs. *lpr*-p21tg 6,5 % células T DN IL-17⁺; en ambos casos *p*-valor < 0,001) (Fig. 21B). Como consecuencia, la población de células T DN se encuentra notablemente disminuida en los ratones *lpr*-p21tg, cuyo porcentaje es 3 veces menor que en los ratones *lpr* (Fig. 21C). Asimismo, los ratones *lpr*-p21tg muestran una drástica disminución en el tamaño de los ganglios linfáticos cervicales respecto a los ratones *lpr* (*lpr*: 820 vs. *lpr*-p21tg: 180 mg, *p*-valor = 0,0009) que puede ser explicada, en parte, por la menor acumulación de células T DN (Fig. 21D).

Estos datos sugieren una función inhibitoria de p21 en la excesiva activación, proliferación y acumulación de las células T DN en los ratones *lpr*.

5.1.3. La sobre-expresión de p21 reduce la activación y acumulación de células T CD4⁺ de memoria en ratones *lpr*

Las células T CD4⁺ tienen un importante papel en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el lupus [87]. Se ha observado que el transgén de p21 reduce notablemente la hiperproliferación de las células T CD4⁺ de los ratones *lpr* *in vivo* (Fig. 22A). Esta población muestra unos niveles de incorporación de BrdU dos veces superiores a los detectados en las células T CD4⁺ *lpr*-p21tg. Sin embargo, este transgén no afecta a los niveles de proliferación de las células T CD4⁺ control, indicando que p21 tiene un efecto específico en las células T auto-reactivas.

En esta Tesis se ha mostrado un llamativo aumento en la población de células T de memoria (CD44^{alto}) *lpr* (ver Fig. 3B, C, 13, 15D, 19A). Esta población puede ser responsable, en parte, del desarrollo de la enfermedad autoinmune en los ratones deficientes en FAS. La sobre-expresión de p21 en los ratones *lpr*

reduce la población de células T CD4⁺ de memoria/activadas (*lpr*: 33 vs. *lpr*-p21tg: 18 % CD44^{alto}CD62L⁺) y de memoria (*lpr*: 18 vs. *lpr*-p21tg: 6 % CD44^{alto}CD62L⁻) (Fig. 22B). Sin embargo, el transgén de p21 no altera los niveles de las poblaciones de células T CD4⁺ de memoria en los ratones control. En concordancia con estos datos, la sobre-expresión de p21 inhibe la excesiva proliferación de las células T CD4⁺ *lpr* de memoria *in vivo* (*lpr* 63 vs. *lpr*-p21tg: 42 % incorporación BrdU en las células CD44^{alto}/CD62L⁺ y *lpr* 43 vs. *lpr*-p21tg: 29 % incorporación BrdU en las células CD44^{alto}/CD62L⁻), sin afectar a las células control (Fig. 22C). Esta reducción en la proliferación de las células de memoria *lpr*-p21tg respecto a *lpr*, se corresponde con una disminución en la producción de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ e IL-17 en la población de células T CD4⁺ CD44^{alto} CD62L⁻ *lpr* al aumentar los niveles de p21 (Fig. 22D).

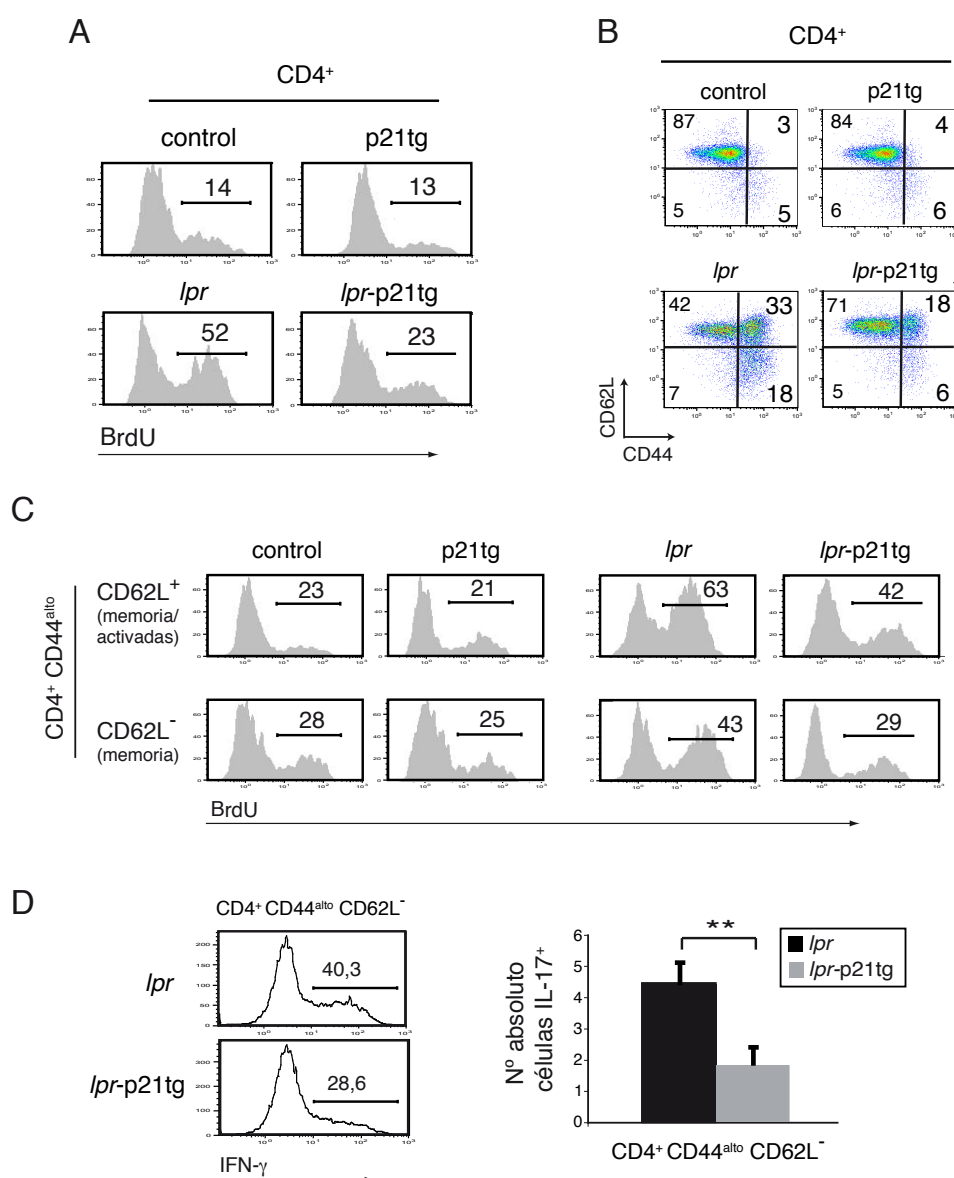


Figura 22. La sobre-expresión de p21 reduce la hiperproliferación de las células T CD4⁺ y T CD4⁺ de memoria deficientes en FAS

(A) Después de 9 días bebiendo BrdU (0,8 mg/ml), se extrajeron los nódulos linfáticos cervicales de ratones control, p21tg, *lpr* y

lpr-p21tg de 2 meses de edad (todos ellos en fondo C57BL/6). Se muestra el porcentaje de BrdU incorporado en las células T CD4⁺. Se enseña un experimento representativo de 3 independientes (n=6). (B) Porcentaje de células CD4⁺ CD44^{alto}/ y CD62L⁺/ en los nódulos linfáticos cervicales de ratones control, p21tg, *lpr* y *lpr*-p21tg de 2 meses de edad. Se muestra un experimento representativo de 3 independientes (n=6). (C) Incorporación de BrdU *in vivo* en las células T CD4⁺ CD44^{alto} y CD62L⁺/ de nódulos linfáticos cervicales de ratones control, p21tg, *lpr* y *lpr*-p21tg de 2 meses de edad. Los ratones bebieron BrdU durante 9 días seguidos. Se muestra un experimento representativo de 3 independientes (n=6). (D) Tinción intracelular de las citoquinas IFN- γ e IL-17 en células de bazo de ratones *lpr* y p21tg-*lpr* de 4 meses de edad estimuladas con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (2 μ g/ml). Se muestran las células T CD4⁺ CD44^{alto} y CD62L⁺. En el panel izquierdo se muestra un experimento representativo del porcentaje de células IFN- γ ⁺. En el panel derecho se ha representado la media + la desviación estándar del número absoluto de células IL-17⁺. El *p*-valor (***) es menor a 0,001 (n = 6 en todos los casos).

Estos resultados, indican que la sobre-expresión de p21 en las células T *lpr* permite controlar la excesiva proliferación de las células T CD4⁺ y T CD4⁺ de memoria *in vivo*, así como la activación y acumulación de estas últimas.

5.1.4. Reducción de las manifestaciones autoinmunes en los ratones C57BL/6-*lpr*-p21tg y MRL-*lpr*-p21tg

El aumento en los niveles de auto-anticuerpos en sangre y las alteraciones glomerulares son importantes manifestaciones patológicas que se identifican con el fenotipo similar al lupus de los ratones deficientes en FAS. La sobre-expresión de p21 en las células T disminuye significativamente los altos títulos de anticuerpos anti-ADN detectados en la sangre de los ratones *lpr* en fondo C57BL/6 (*lpr*: 1,4 vs. *lpr*-p21tg: 0,6 OD, *p*-valor = 0,0009) (Fig. 23A).

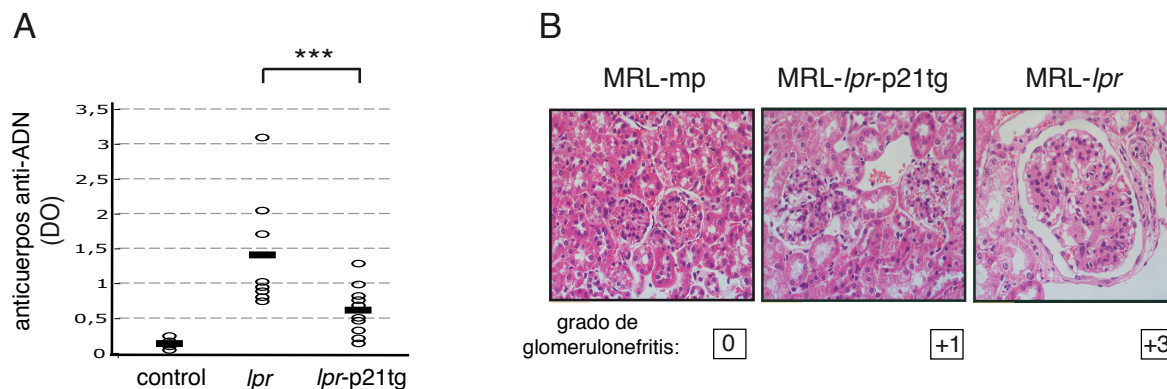


Figura 23. La sobre-expresión de p21 en las células T disminuye la patología autoinmune de los ratones *lpr*

(A) Niveles relativos de IgG total anti-ADN detectados mediante ELISA en el suero de ratones control, *lpr* y p21tg-*lpr* (todos ellos en fondo C57BL/6) de 4 meses de edad. Las barras negras representan el valor de la media (n=10). El *p*-valor (***) es menor a 0,001. (B) Secciones de glomérulos representativos de ratones MRL-*mp* (control negativo), MRL-*lpr* y MRL-*lpr*-p21tg hembras de 6 meses de edad. Se muestra la clasificación del grado de glomerulonefritis según la escala de Berden [113] (ver apartado de

materiales y métodos).

Como se ha comentado anteriormente, los ratones con fondo genético MRL-*mp* son más susceptibles al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, se analizó si la sobre-expresión de p21, además de disminuir el desarrollo moderado de autoinmunidad de los ratones C57BL/6-*lpr*, también podía reducir la severa enfermedad letal presentada por los ratones MRL-*lpr*. Tras analizar los niveles de anticuerpos anti-ADN en los ratones MRL-*lpr*-p21tg, se obtuvieron resultados similares a los descritos en la Figura 23A (datos no mostrados). Asimismo, el análisis de cortes parafinados de riñón reveló que la sobre-expresión de p21 en las células T disminuye la severidad de las lesiones glomerulares en los ratones MRL-*lpr*-p21tg, respecto a los ratones MRL-*lpr* (Fig. 23B). De este modo, los ratones MRL-*lpr* muestran un grado de glomerulonefritis 3, que se reduce a grado 1 en los ratones MRL-*lpr*-p21tg.

En conjunto, estos resultados indican que los elevados niveles de p21 disminuyen la activación/proliferación de las células T *lpr* y, como consecuencia, se reduce notablemente la severidad del fenotipo autoinmune de los ratones deficientes en FAS.

5.1.5. La sobre-expresión de p21 rescata la elevada incidencia de muerte de los ratones MRL-*lpr*

En los ratones MRL-*lpr* existen dos factores que contribuyen de manera significativa a disminuir su esperanza de vida: un fondo genético susceptible al desarrollo de enfermedades autoinmunes y la ausencia de FAS. Se ha descrito en esta Tesis que la sobre-expresión de p21 en las células T tiene importantes efectos paliativos en la enfermedad autoinmune de los ratones *lpr* (Fig. 23). En base a estos resultados, se examinó si la expresión del transgén de p21 en las células T podía frenar la precipitada muerte de los ratones MRL-*lpr*. Por lo tanto, se realizó un estudio de supervivencia con 25 ratones MRL-*mp*, MRL-*lpr* y MRL-*lpr*-p21tg durante 15 meses. De este modo, se corroboró que el 90 % de los ratones MRL-*lpr* muere antes de los 10 meses de edad. Sin embargo, cabe destacar que a los 15 meses de edad los ratones MRL-*lpr*-p21tg muestran un porcentaje de supervivencia por encima del 80 %, muy similar al encontrado en los ratones control MRL-*mp*. (Fig. 24A).

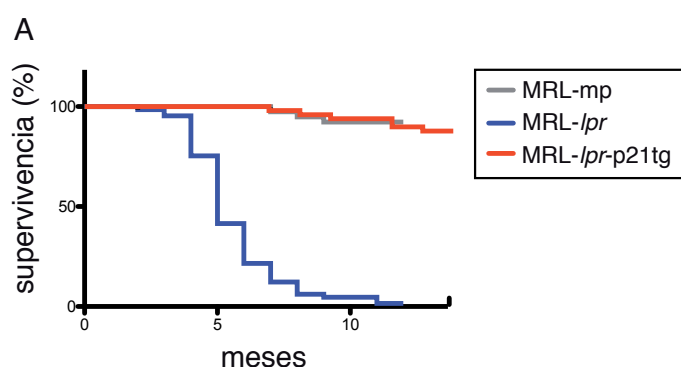


Figura 24. La sobre-expresión de p21 en las células T aumenta la supervivencia de los ratones MRL-*lpr*

(A) Porcentaje de supervivencia calculado por el método de Kaplan Meier en 25 ratones MRL-*mp* (control), MRL-*lpr* y MRL-*lpr*-p21tg a lo largo de 15 meses (n=25).

Este estudio demuestra que el control de la hiperproliferación de las células T *lpr*, mediante la sobreexpresión de p21, es capaz de reducir la elevada incidencia de muerte de los ratones MRL-*lpr*, derivada de su enfermedad tipo lupus.

En su conjunto, los datos de este bloque demuestran que la expresión dirigida del transgén p21 en las células T tiene un doble efecto en los ratones *lpr*, reduciendo tanto la linfadenopatía como las manifestaciones autoinmunes.

5.2. La ausencia de p21 agrava la patología autoinmune de los ratones *lpr*

Los datos obtenidos con los ratones *lpr*-p21tg ponen de manifiesto el importante papel de la proliferación de las células T en el desarrollo de autoinmunidad. A continuación, se generaron ratones deficientes en FAS y p21 en fondo C57BL/6 (en adelante, *lpr*-p21^{-/-}) para estudiar la activación/proliferación de las células T bajo la ausencia de ambas moléculas, así como su influencia en el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

5.2.1. La falta de p21 incrementa la activación y proliferación de las células T CD4⁺ *lpr* *in vitro*

Se estudió la capacidad de activación y proliferación de las células T CD4⁺ *lpr*-p21^{-/-} durante una re-estimulación *in vitro*, en comparación con las células *lpr*.

Durante una re-estimulación con conA + hr-IL2 se observó un incremento en la fosforilación de ERK-1/2 y una mayor degradación de IκBα (indicativa de una mayor activación de NF-κB) en las células T CD4⁺ *lpr*-p21^{-/-}, en comparación con las células T CD4⁺ *lpr* (Fig. 25A). Además, durante las 4 primeras horas de una 2ª estimulación *in vitro* con PMA e ionomicina, las células T CD4⁺ *lpr*-p21^{-/-} presentan una mayor producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-17 e IL-2 que las células *lpr*, p21^{-/-} y control (*lpr* 3,8 vs. *lpr*-p21^{-/-} 6,5 % células T CD4⁺ IL-17⁺ y *lpr* 2,6 vs. *lpr*-p21^{-/-} 4,8 % células T CD4⁺ IL-2⁺) (Fig. 25B).

Dado el importante papel de la población de células T CD4⁺ de memoria/activadas (CD44^{alto} CD62L⁺) en los ratones *lpr* (ver Fig. 3B, 3C, 13, 15D, 22B y C), se estudió la producción intracelular de algunas citoquinas pro-inflamatorias en esta población durante una 2ª estimulación *in vitro* con PMA e ionomicina (Fig. 25C). De este modo, se detectó una mayor producción de IFN-γ, IL-17 e IL-2 en la población de células T CD4⁺ de memoria/activadas *lpr*-p21^{-/-} que en las células *lpr* (*lpr* 8 vs. *lpr*-p21^{-/-} 18 % células CD44^{alto} CD62L⁺ IFN-γ⁺; *lpr* 7 vs. *lpr*-p21^{-/-} 16 % células CD44^{alto} CD62L⁺ IL-17⁺ y *lpr* 6,5 vs. *lpr*-p21^{-/-} 15 % células CD44^{alto} CD62L⁺ IL-2⁺).

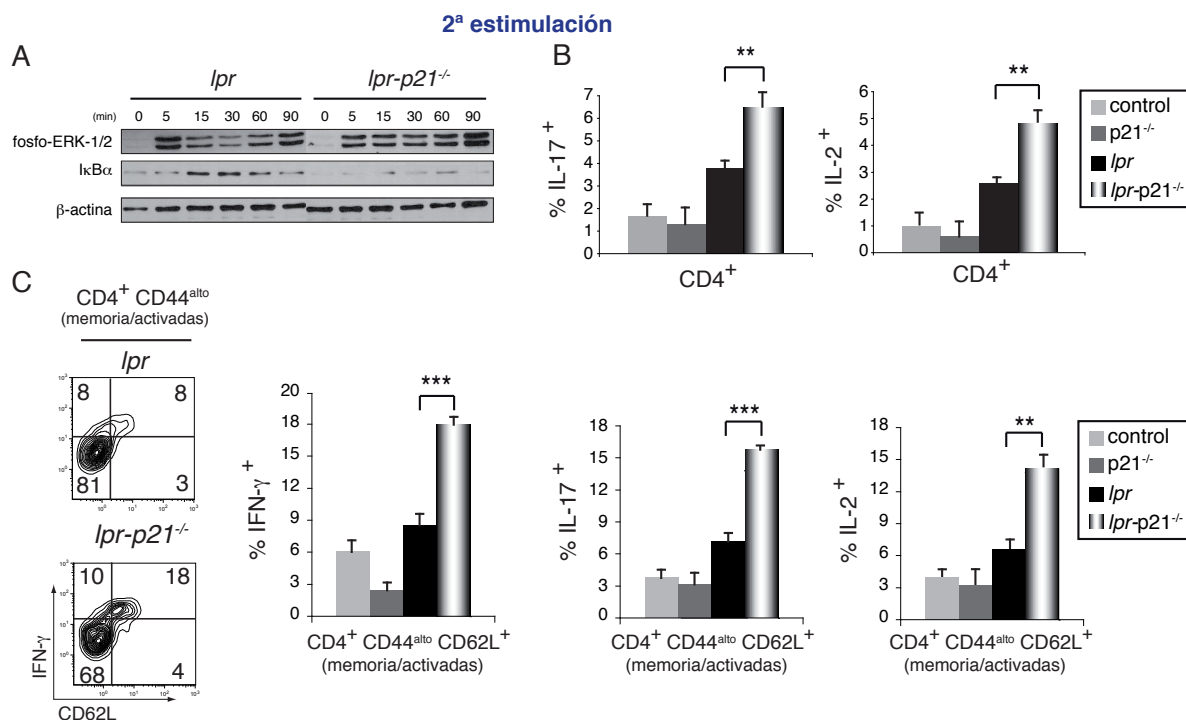


Figura 25. La ausencia de p21 aumenta la activación de las células T CD4⁺ *lpr* in vitro

(A) Análisis por *western blot* de la cinética de fosforilación de ERK-1/2 y de degradación de IκB-α en lisados de células T CD4⁺ *lpr* y *lpr-p21*^{-/-} (aisladas de ratones de 2 meses de fondo C57BL/6) en los tiempos indicados de una 2ª estimulación con conA (3 μg/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml). Experimento representativo de un total de 2. (B) Porcentaje de células T CD4⁺ de ratones de 2 meses control, *p21*^{-/-}, *lpr* y *lpr-p21*^{-/-} con señal positiva para el marcaje intracelular de IL-17 e IL-2, realizado a las 4 h de una 2ª estimulación con PMA (40 ng/ml) e ionomicina (1 μg/ml) a razón de 1x10⁶ células/ml (n=3). (C) A la izquierda se muestran los niveles intracelulares de IFN-γ respecto a CD62L medidos por CMF en las células T CD4⁺ CD44^{alto} de ratones de 2 meses *lpr* y *lpr-p21*^{-/-}. Estas células se estimularon por 2ª vez con PMA (40 ng/ml) e ionomicina (1 μg/ml) durante 4 h a razón de 1x10⁶ células/ml. Bajo las mismas condiciones de estimulación, se muestran representados en gráficos de barras los porcentajes de las células T CD4⁺ CD44^{alto} CD62L⁺ con señal positiva para las citoquinas intracelulares IFN-γ, IL-17 e IL-2 en ratones control, *p21*^{-/-}, *lpr* y *lpr-p21*^{-/-}. Se enseña un experimento representativo, n=2. El *p*-valor (**, ***) es menor a 0,01 y 0,001, respectivamente.

La excesiva activación de las células T CD4⁺ *lpr-p21*^{-/-} durante una estimulación repetida, coincide con una mayor capacidad proliferativa de estas células respecto a los linfocitos *lpr*. Este hecho se comprobó mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada, realizado durante una 2ª estimulación en presencia de z-VAD (*lpr*: 17.700 cpm y *lpr-p21*^{-/-}: 39.050, *p*-valor: 0,0009) (Fig. 26A). Además, a lo largo de una estimulación secundaria las células T CD4⁺ (IP negativas) deficientes en FAS y p21 muestran una mayor capacidad de división que las células control, *p21*^{-/-} y *lpr* (Fig. 26B).

Asimismo, se analizó el perfil del ciclo celular en las células T CD4⁺ control, *p21*^{-/-}, *lpr* y *lpr-p21*^{-/-} durante una 3ª estimulación con conA + hr-IL2, donde no hay inducción de apoptosis (ver Fig. 6). Se detectó un

mayor porcentaje de células T CD4⁺ *lpr*-p21^{-/-} en las fases del ciclo celular S-G2-M (43 %) respecto a las células control (22 %), p21^{-/-} (35 %) y *lpr* (30 %) (Fig. 26C). Tal y como se esperaba, no se detectaron diferencias en la sensibilidad apoptótica entre las células T *lpr* y *lpr*-p21^{-/-} debido a la ausencia de FAS. Asimismo, estos datos fueron confirmados mediante una tinción con anexina-V-IP (datos no mostrados).

En conjunto, estos datos apuntan a un efecto aditivo de FAS y p21 en el control de la activación y proliferación de las células T CD4⁺ durante una estimulación repetida *in vitro*.

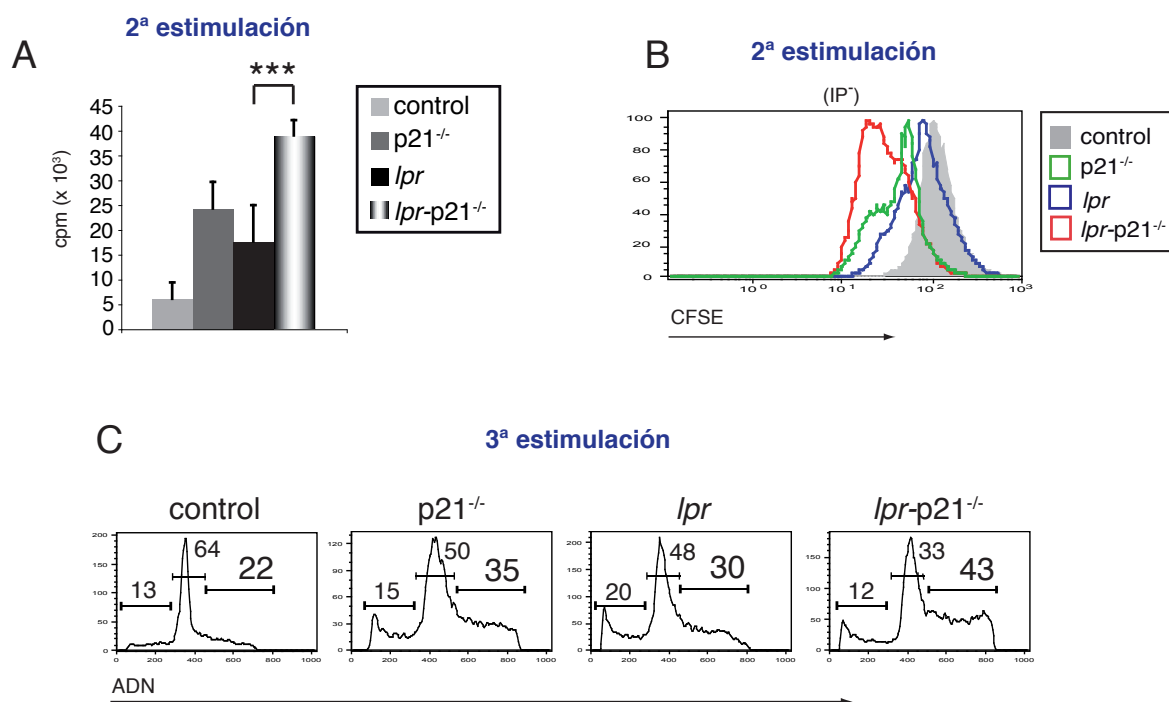


Figura 26. La ausencia de p21 incrementa la proliferación de las células T CD4⁺ *lpr* *in vitro*

(A) Incorporación de timidina tritiada en células T CD4⁺ control, p21^{-/-}, *lpr* y *lpr*-p21^{-/-} (aisladas de ratones de 2 meses de fondo C57BL/6) a las 48 h de una 2ª estimulación con conA (3 µg/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml) en presencia de z-VAD 50 µM. Los datos muestran la media y la desviación estándar. El *p*-valor (***) es menor a 0,001 (n=5). (B) Dilución de la señal de CFSE en células T CD4⁺ control, p21^{-/-}, *lpr* y *lpr*-p21^{-/-} (aisladas de ratones de 2 meses) a las 72 h de una estimulación secundaria con conA (3 µg/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml). Se muestran las células IP negativas. Este experimento es representativo de un total de 2. (C) Análisis del ciclo celular, donde se muestra el porcentaje de células T CD4⁺ control, p21^{-/-}, *lpr* y *lpr*-p21^{-/-} (aisladas de ratones de 2 meses de edad) en las fases de muerte-apoptosis/G0-G1/S-G2-M (de izquierda a derecha) a las 24 h de una 3ª estimulación con conA (3 µg/ml) y hr-IL2 (20 ng/ml). Se enseña un experimento representativo de 3 independientes.

5.2.2. Mayor activación de las células T CD4⁺ y T CD4⁺ de memoria en los ratones *lpr*-p21^{-/-} vs. *lpr*

Para analizar la capacidad de activación de las células T CD4⁺ de los ratones *lpr*-p21^{-/-}, se analizó la producción de IFN-γ *ex vivo* en las células recién extraídas del bazo y estimuladas con PMA e ionomicina. De este modo, se detectó un mayor porcentaje de células T CD4⁺ con señal positiva para el marcaje in-

tracelular de IFN- γ en los ratones *lpr*-p21^{-/-} (10 %), en comparación con los ratones *lpr* (4,7 %) (Fig. 27A).

Anteriormente se ha demostrado que la sobre-expresión de p21 en las células T disminuye de manera efectiva la elevada acumulación de células T CD4⁺ de memoria/activadas (CD44^{alto}, CD62L⁺), que se generan de manera espontánea en los ratones *lpr* (ver Fig. 3B y Fig. 22B). A continuación se estudió si la acumulación de esta población se ve influenciada por la ausencia de p21 en los ratones *lpr*. A los 6 meses de edad, los ratones *lpr*-p21^{-/-} muestran un porcentaje de células T CD4⁺ de memoria/activadas en los órganos linfoides secundarios mayor que los ratones *lpr* (bazo: *lpr* 11,3 y *lpr*-p21^{-/-} 22,8 % células T CD4⁺ de memoria/activadas, *p*-valor = 0,008; ganglios: *lpr* 24,8 y *lpr*-p21^{-/-} 46 % células T CD4⁺ de memoria/activadas, *p*-valor=0,0007) (Fig. 27B). No se encontraron diferencias significativas en la acumulación de células T CD8⁺ de memoria entre estas dos cepas de ratones (datos no mostrados). En relación con los datos anteriores, la población de células T CD4⁺ de memoria/activadas *lpr*-p21^{-/-} muestra una mayor capacidad de producción de IL-17 que las células *lpr* durante una estimulación *ex vivo* con PMA e ionomicina (Fig. 27C).

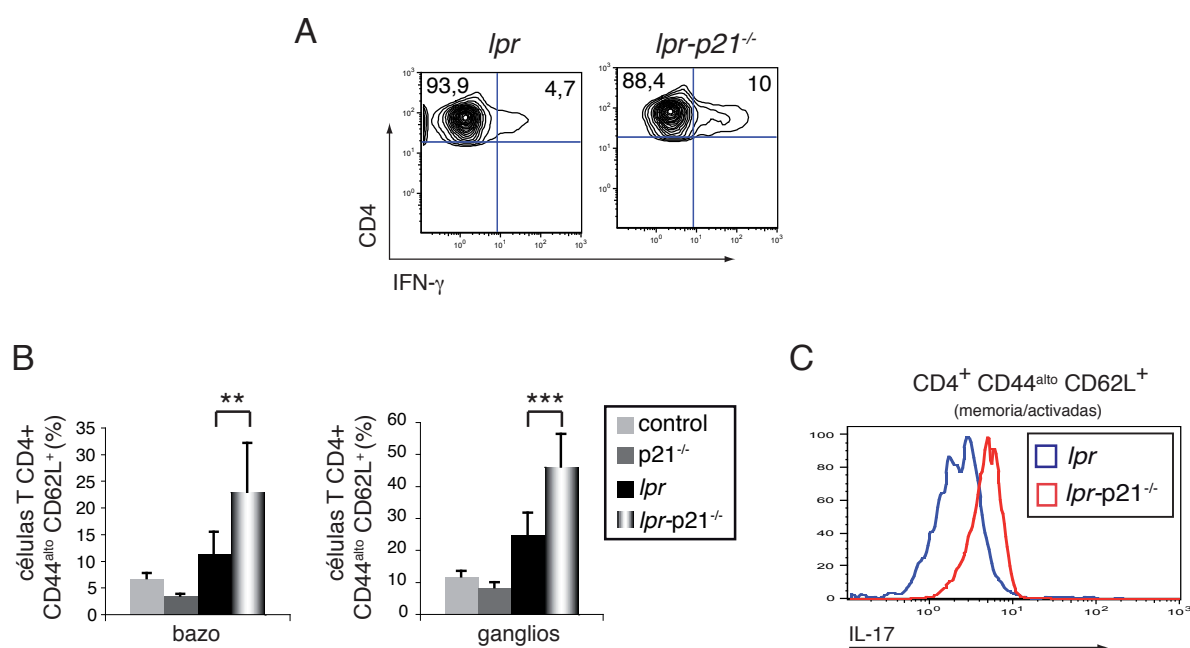


Figura 27. Hiperactivación de las células T CD4⁺ y T CD4⁺ de memoria/activadas en los ratones *lpr*-p21^{-/-}

(A) Niveles intracelulares de IFN- γ medidos por CMF en células T CD4⁺ de bazo de ratones *lpr* y *lpr*-p21^{-/-} de 1 mes de edad de fondo genético C57BL/6. La estimulación se realizó con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (1 μ g/ml) a razón de 5x10⁶ células/ml. Se muestra un experimento representativo, n=4. (B) Media y desviación estándar del porcentaje de células T CD4⁺ CD44^{alto} CD62L⁺ en bazo (izquierda) y ganglios linfáticos (derecha) de ratones control, p21^{-/-}, *lpr* y *lpr*-p21^{-/-} de 6 meses de edad. El *p*-valor (**, ***) es menor que 0,01 y 0,001, respectivamente (n=7). (C) Niveles intracelulares de IL-17 medidos por citometría de flujo en células CD4⁺ CD44^{alto} CD62L⁺ del bazo de ratones *lpr* y *lpr*-p21^{-/-} de 1 mes de edad. Estas células fueron estimuladas con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (1 μ g/ml) a razón de 5x10⁶ células/ml. Se muestra un experimento representativo, n=3.

Estos datos indican que las células T CD4⁺ de los ratones *lpr-p21*^{-/-} tienen una mayor capacidad de producción de IFN- γ que en los ratones *lpr*. Asimismo, se encontró una mayor acumulación y activación de las células T CD4⁺ de memoria/activadas en los órganos linfoides secundarios de los ratones *lpr-p21*^{-/-} respecto a los ratones deficientes en FAS.

5.2.3. La ausencia de p21 agrava la enfermedad autoinmune de los ratones *lpr*

La presencia de altos títulos de anticuerpos anti-ADN es uno de los múltiples rasgos patológicos autoinmunes que caracterizan a los ratones *lpr*. Se midieron mediante ELISA los niveles en suero de diferentes isotipos de anticuerpos anti-ADN (IgG2a, IgG3, IgG1, IgG2b, IgM) en ratones control, *p21*^{-/-}, *lpr* y *lpr-p21*^{-/-} de 8 meses de edad (Fig. 28A). Se encontró un aumento significativo en los niveles de los isotipos IgG2a e IgG3 anti-ADN en los ratones *lpr-p21*^{-/-} respecto a los ratones *lpr* (IgG2a: *lpr* 9,8 vs. *lpr-p21*^{-/-} 60 OD media; IgG3: *lpr* 5,3 vs. *lpr-p21*^{-/-} 17,08 OD media). Ambos isotipos tienen un importante papel patogénico en el desarrollo de glomerulonefritis [36, 126, 127]. También se detectó un significativo incremento en los niveles de los isotipos IgG1 e IgG2b anti-ADN en los ratones *lpr-p21*^{-/-}, respecto a los ratones *lpr* (IgG1: *lpr* 3,3 vs. *lpr-p21*^{-/-} 8,2 OD media; IgG2b *lpr* 41,2 vs. *lpr-p21*^{-/-} 146,5 OD media). Los niveles de IgM resultaron similares en ambos ratones (IgM: *lpr* 617,3 vs. *lpr-p21*^{-/-} 699,3 OD media; p-valor < 0,05).

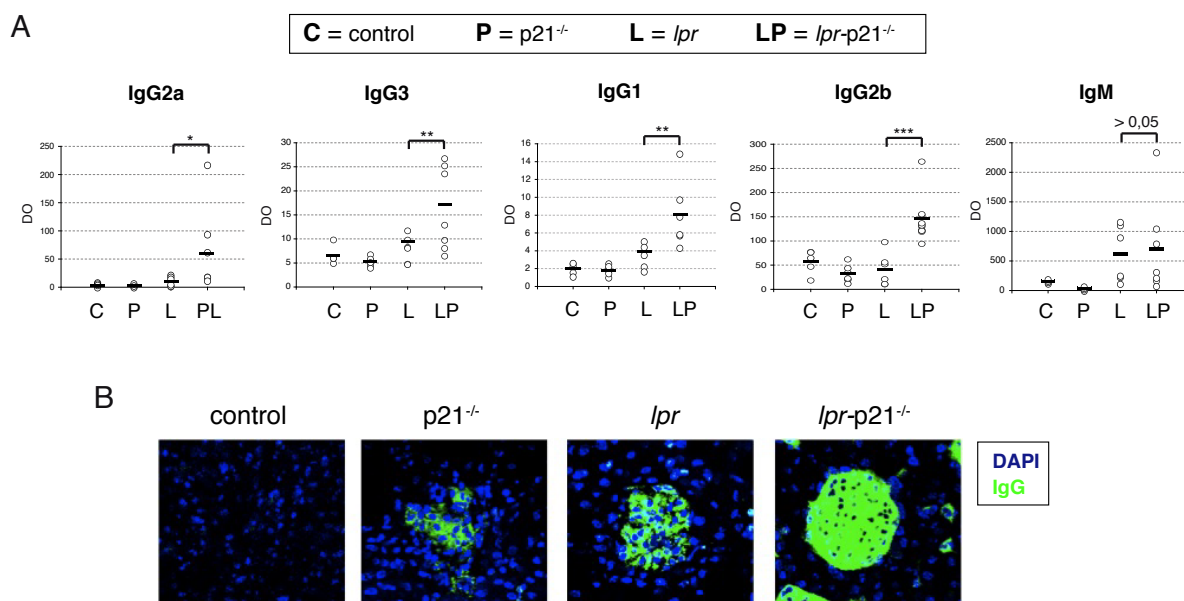


Figura 28. La ausencia de p21 incrementa la severidad del fenotipo autoinmune de los ratones *lpr*

(A) Niveles relativos de diferentes isotipos IgG (2a, 3, 1, 2b, M) anti-ADN medidos por ELISA en el suero de ratones control, *p21*^{-/-}, *lpr* y *lpr-p21*^{-/-} de 8 meses de edad en fondo genético C57BL/6. Las barras negras representan el valor medio (n=7). Las cifras del p-valor (*, **, ***) son menores a 0,05, 0,01 y 0,001, respectivamente. (B) Inmunofluorescencia en criocortes de riñón procedentes de ratones control, *p21*^{-/-}, *lpr* y *lpr-p21*^{-/-} de 8 meses teñidos con DAPI (azul) y con un anticuerpo para detectar IgG total (verde). Se muestra un corte representativo (n=4).

El fenotipo de los ratones deficientes en FAS está asociado al desarrollo de alteraciones en el riñón, entre las que podemos destacar el depósito de inmunocomplejos, formados por la asociación de anticuerpos con antígenos. Utilizando una técnica de inmunofluorescencia en criocortes de riñón extraídos de ratones de 8 meses de edad, se comprobó que, en los ratones *lpr*-p21^{-/-} los niveles de IgG total eran llamativamente mayores que en los ratones *lpr*, y estos últimos a su vez superiores a los encontrados en los ratones p21^{-/-} (Fig. 28B).

En conjunto, estos datos indican que la ausencia de p21 contribuye a aumentar notablemente la gravedad del fenotipo autoinmune de los ratones *lpr*, incrementando los títulos de auto-anticuerpos en sangre y la presencia de inmunocomplejos en el riñón.

5.2.4. La falta de p21 reduce la supervivencia de los ratones C57BL/6-*lpr*

Los datos anteriores ilustran el grave fenotipo autoinmune, similar al lupus, desarrollado por los ratones *lpr*-p21^{-/-}. La aparición de nefritis conduce a un importante fallo renal, siendo ésta una importante causa de mortalidad en los pacientes con lupus [128]. Se estudió si la grave enfermedad autoinmune desarrollada por los ratones *lpr*-p21^{-/-} podía afectar a su supervivencia. Para ello, se realizó un estudio de supervivencia con 20 ratones control, p21^{-/-}, *lpr* o *lpr*-p21^{-/-} a lo largo de 18 meses. El porcentaje de supervivencia se ve notablemente disminuido en los ratones *lpr*-p21^{-/-}, dado que el 50 % de la población analizada muere al año de edad. Sin embargo, los ratones *lpr*, p21^{-/-} o control muestran unas tasas de supervivencia muy similares entre todos ellos (Fig. 29A).

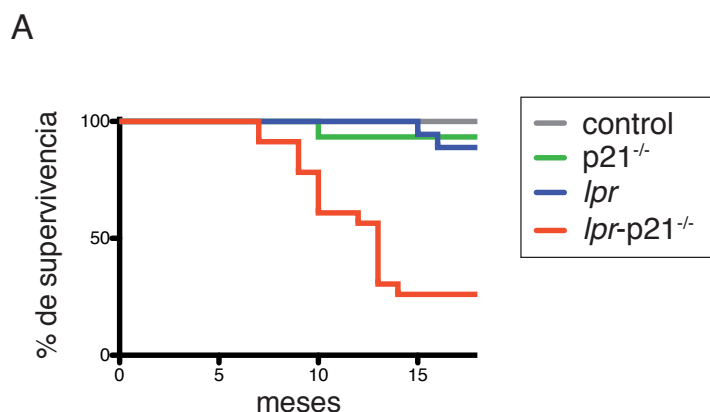


Figura 29. Disminución en la supervivencia de los ratones *lpr*-p21^{-/-}

Porcentaje de supervivencia, calculado por el método de Kaplan Meier en ratones control, p21^{-/-}, *lpr* y *lpr*-p21^{-/-} a lo largo de 18 meses (n=20). Ratones en fondo genético C57BL/6.

Este análisis demuestra que los ratones doble deficientes en p21 y FAS tienen una mayor incidencia de mortalidad que los ratones control, p21^{-/-} y *lpr*.

Los datos descritos en este último apartado corroboran la relación existente entre la hiperactivación/hiperproliferación de las células T CD4⁺ (de memoria) y el desarrollo de la enfermedad autoinmune que es, en última instancia, la responsable de la elevada mortalidad detectada en los ratones *lpr*-p21^{-/-}.

DISCUSIÓN

**“Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre
cabe discusión”**

José Ortega y Gasset. Filósofo y ensayista español
(1883-1955).

pro-apoptosis

homeostasis

FAS

anti-proliferación

auto-antígenos

lpr-p21^{-/-}

enfermedad autoinmune

1. Ratones *lpr*, más allá del papel pro-apoptótico de FAS

Para mantener la homeostasis inmunológica debe haber un balance entre los procesos de activación, proliferación y muerte de las células T.

FAS es un receptor de membrana que, tras la interacción con FAS-L induce la muerte de las células T activadas (AICD) *in vitro*. En múltiples estudios realizados con ratones deficientes en FAS se ha descrito que este receptor ejerce un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica, puesto que su pérdida conduce al desarrollo de autoinmunidad [62, 129]. Cabe destacar que, en los ratones *lpr* las células T DN, CD4⁺ y CD8⁺ muestran un perfil hiperproliferativo *in vivo* [66, 67]. En concordancia con estos trabajos, en esta Tesis se observó que los ratones C57BL/6-*lpr* presentan un fenotipo caracterizado por una notable linfadenopatía, esplenomegalia (Fig. 1), acumulación de células T hiperproliferativas CD4⁺, CD8⁺, DN (TCR-β⁺B220⁺CD4⁻CD8⁻) y de memoria (Fig. 2, 3). Sin embargo, se desconoce el origen de esta hiperproliferación, así como su influencia en el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

La mayoría de los estudios llevados a cabo con ratones deficientes en FAS se han realizado en fondos genéticos pro-autoinmunes, como el MRL-*mp* [130]. Los ratones C57BL/6-*lpr* tienen un fondo genético que no muestra una tendencia al desarrollo de enfermedades autoinmunes. No obstante, estos ratones presentan evidentes indicios de enfermedad (23A, 28A y B). Estos datos indican que la falta de FAS es la causa de este fenotipo y no el fondo genético, aunque este último puede ayudar a exacerbar las manifestaciones patológicas.

Tradicionalmente se ha justificado el fenotipo de los ratones *lpr* con explicaciones basadas en su defecto en AICD, que conduciría a una acumulación de linfocitos auto-reactivos [62, 131, 132]. Sin embargo, como se discutirá a continuación, no se ha demostrado la implicación de FAS en el proceso de AICD *in vivo* [45]. Se ha descrito que la delección inducida tras la estimulación con un antígeno específico en ratones transgénicos para el TCR [46] o después de una respuesta a un superantígeno [47, 48], requiere la expresión de FAS. Sin embargo, la relevancia fisiológica de estos modelos no está establecida. Por otro lado, se ha propuesto que además de FAS, la molécula pro-apoptótica Bim ejerce un importante papel en la eliminación de células T durante la fase de contracción clonal [133-135]. En relación con estos estudios, se ha descrito que los ratones doble deficientes en FAS y Bim desarrollan un fenotipo autoinmune con rasgos más agudos que los encontrados en los ratones *lpr*, resaltando el papel de ambas moléculas en el establecimiento de tolerancia [133].

Asimismo, existen estudios que sugieren que FAS tiene funciones alternativas a la inducción de apoptosis. Tal y como se ha explicado anteriormente (ver apartado 4.2., introducción), los trabajos realizados con ratones deficientes en FADD o C-8 indican que el defecto en apoptosis no es suficiente para explicar el fenotipo autoinmune de los ratones *lpr*. Estos modelos murinos deficientes en FADD o C-8 específica-

mente en las células T, así como los pacientes con defectos en C-8, presentan un fallo evidente en la inducción de apoptosis. Sin embargo, todos ellos tienen un fenotipo de inmunodeficiencia generalizada [72, 74-76, 80], que contrasta con el fenotipo autoinmune de los ratones deficientes en FAS o FAS-L (esquema 9, introducción). Además, las células T deficientes en FADD o C-8 presentan defectos proliferativos [77-81]. El análisis de estos estudios en su conjunto revela que, aunque la proliferación y la muerte celular parecen ser fenómenos opuestos y mutuamente excluyentes, existe una relación entre ambos procesos.

Anteriormente, se han descrito otras funciones de FAS alternativas a la apoptosis que relacionan a este receptor con el sistema nervioso central (regeneración, crecimiento de neuritas), corazón, páncreas, colon, así como con la progresión de tumores y la regeneración del hígado, revisado en [136].

Todos estos trabajos cuestionan la implicación de FAS en la inducción de apoptosis *in vivo*, o proponen funciones alternativas para este receptor. En concordancia con estos estudios, en esta Tesis se ha comprobado que FAS, además de su conocido papel pro-apoptótico, ejerce un importante papel en el control de la activación y proliferación de las células T, que es esencial para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica.

2. FAS ejerce una regulación negativa de la proliferación de las células T estimuladas de manera repetida

El defecto en la expresión de FAS afecta a todas las células de los ratones *lpr*. Sin embargo, se ha descrito que los ratones MRL-*lpr* carentes de células T CD4⁺ no presentan alteraciones renales ni acumulación de auto-anticuerpos [137], resaltando el papel de estas células en el desarrollo de la enfermedad autoinmune [87, 138, 139]. Por esta razón, se limitaron la mayoría de los estudios realizados en esta Tesis a las células T CD4⁺, para estudiar la implicación de FAS en el control de su proliferación.

Tal y como se ha descrito, no se han detectado diferencias significativas en la capacidad proliferativa de las células T CD4⁺ C56BL/6 (control) y C56BL/6-*lpr* (*lpr*) *naïve* durante una estimulación primaria con conA + hrIL-2 (Fig. 4). No obstante, existen diversos estudios que apuntan a un papel co-estimulador de FAS/FAS-L en la proliferación primaria de las células T estimuladas con anti-CD3 [120, 140]. Por otro lado, en contraste con estos trabajos, se ha demostrado que FAS-L bloquea la activación y proliferación de las células T *naïve* humanas bajo condiciones de estimulación con dosis muy bajas de anti-CD3/anti-CD28 [141]. Cabe destacar que todos estos estudios se han realizado bajo condiciones de estimulación no óptimas. Por lo tanto, la discrepancia de resultados parece indicar que el papel de FAS en la activación y proliferación primaria de las células T depende de las condiciones de estimulación.

Durante una respuesta autoinmune, una célula T auto-reactiva se encuentra con un mismo auto-anti-

geno en repetidas ocasiones, debido a su persistencia en el organismo. Por lo tanto, se centró el estudio del papel de FAS en la proliferación de las células T estimuladas de manera repetida *in vitro* (esquema 11, materiales y métodos). De este modo, se detectó un sorprendente papel de FAS como regulador negativo de la proliferación de las células T CD4⁺ durante una 2^a estimulación con conA + hrIL-2 (Fig. 5). Podría argumentarse que, debido a la falta de FAS, las células T *lpr* resistentes al proceso de AICD que tiene lugar durante una 2^a estimulación simplemente se acumulan, sin implicar una mayor capacidad proliferativa de las mismas. Este argumento ha podido enmascarar el papel anti-proliferativo de FAS en los múltiples estudios realizados con células T *lpr* anteriormente [46]. Sin embargo, los resultados obtenidos en presencia del inhibidor de caspasas z-VAD [105] muestran un perfil hiperproliferativo de las células T CD4⁺ *lpr* bajo condiciones donde la apoptosis estaba bloqueada (Fig. 5B, C y D). De igual manera, los ensayos en los que se realizó una tinción de CFSE en las células vivas (anexina-V⁻ IP⁺) demuestran que FAS controla la división de las células T supervivientes a una 2^a estimulación (Fig. 5E).

Para solventar la discrepancia en la sensibilidad apoptótica existente entre las células T CD4⁺ control y *lpr*, evitando el uso de inhibidores como z-VAD, se descartó a las células muertas resultantes del proceso de AICD y las células supervivientes se estimularon por 3^a vez con conA + hrIL-2 (Fig. 6A). Cabe destacar que, la exposición a IL-2 aumenta la sensibilidad a apoptosis en las células T [43], y en esta 3^a estimulación no hay una expansión previa con esta citoquina. Además, durante una estimulación repetida se produce un aumento progresivo en el porcentaje de células T CD4⁺ de memoria (CD44^{alto}) en ausencia de FAS (Fig. 13A, B), que son más resistentes a la muerte inducida por FAS/FAS-L que las células T *naïve* [142]. Bajo estas condiciones libres de apoptosis, las células T CD4⁺ deficientes en FAS presentan una clara ventaja proliferativa sobre las células control, que no puede ser atribuida a una mayor capacidad de supervivencia de las mismas (Fig. 6). Por esta razón, se realizaron la mayoría de los estudios *in vitro* a lo largo de una 3^a estimulación.

Según estos datos, se puede concluir que el papel de FAS como regulador negativo de la proliferación de las células T CD4⁺ sólo se manifiesta en **las células re-estimuladas, que presentan un fenotipo mayoritario de memoria**, sin afectar a las células *naïve*. Esta afirmación conduce a preguntarse por qué FAS reprime la proliferación de manera específica en las células T estimuladas reiteradamente. Existen numerosos trabajos que describen diferencias fenotípicas y funcionales entre las células T *naïve* y las células de memoria, que podrían explicar la especificidad de la regulación negativa ejercida por FAS. De este modo, se ha descrito que, después de la presentación de un antígeno, una célula T de memoria ejerce una respuesta más rápida, fuerte y prolongada que una célula T *naïve* [108]. Asimismo, en comparación con las células T *naïve*, las células T de memoria presentan un menor umbral de activación [143], dependen en menor medida de las señales de co-estimulación, pueden responder de manera eficaz a muchos tipos de APC [144] y además son más resistentes a la inducción de tolerancia [5]. Cabe mencionar que,

durante la transición de células T *naïve* a células T de memoria se producen importantes modificaciones epigenéticas [145], que podrían estar relacionadas con las diferencias existentes en la activación de determinadas moléculas tras la estimulación del TCR (revisado en [146]). En relación con el protocolo de estimulaciones repetidas utilizado en esta Tesis, se ha sugerido que las células T activadas tienen una mayor expresión de FAS-L que las células T *naïve* [41]. Por consiguiente, la interacción de FAS/FAS-L tendría un mayor efecto inhibitor en células T de memoria/activadas, generadas durante una re-estimulación, que en las células T *naïve*. Por lo tanto, todos estos estudios podrían argumentar el efecto específico de FAS durante una estimulación repetida.

3. Relación entre hiperproliferación e hiperactivación en las células T *lpr* de memoria

Se ha discutido en el apartado anterior que las células T *lpr* con fenotipo de memoria presentan una notable ventaja proliferativa durante una estimulación repetida. Se analizó si esta hiperproliferación podía deberse a un estado de hiperactivación en las células T deficientes en FAS durante una 3ª estimulación. Para ello, se examinaron diferentes moléculas implicadas en la activación de las células T: NF- κ B, ERK-1/2, CD25 y varias citoquinas pro-inflamatorias [20, 21, 23].

3.1. Hiperactivación de NF- κ B y ERK-1/2 en las células T CD4⁺ *lpr* durante una estimulación repetida

Se ha descrito que pacientes con enfermedades autoinmunes como el ALPS, lupus, artritis reumatoide o psoriasis presentan una mayor activación de ERK-1/2 o NF- κ B [18, 21, 147]. Por lo tanto, se estudió la activación de NF- κ B y ERK-1/2 en los ratones *lpr*.

En concordancia con la similar proliferación detectada entre las células T CD4⁺ control y *lpr* durante una estimulación primaria con conA + hr-IL2 (Fig. 4), no se encontraron diferencias significativas en la activación de NF- κ B (Fig. 8A) y ERK-1/2 (Fig. 11A) bajo estas mismas condiciones. No obstante, durante una re-estimulación se detectó un llamativo aumento en la activación de NF- κ B (Fig. 8B, C, D). Por otro lado, la mayor activación de AP-1 detectada en las células T CD4⁺ *lpr* durante una 3ª estimulación (Fig. 9A) podría relacionarse con la hiperactivación detectada en una de las moléculas responsables de su inducción, ERK-1/2 (Fig. 11C).

Para completar el estudio de la implicación de estas moléculas en la hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr*, se utilizó el inhibidor de NF- κ B, BAY 117082 [107](Fig. 10), y el inhibidor de ERK-1/2, U0126 [106] (Fig. 12). Cabe resaltar que, ambos inhibidores reducen específicamente la proliferación de las células T *lpr* de memoria/activadas generadas durante una 3ª estimulación, sin afectar a las células control (Fig. 10 y 12). Este efecto anti-proliferativo específico de BAY 117082 en las células T CD4⁺ *lpr* no se puede atribuir

a una posible inducción de muerte en las células T control (Fig. 10B). También cabe mencionar que no existe un efecto específico de U0126 en las células T *lpr naïve* durante una 1ª estimulación (Fig. 12B), corroborando de este modo la especificidad de este inhibidor por las células de memoria. Existen varios estudios donde la aplicación de inhibidores de NF- κ B en modelos de inflamación *in vivo*, tales como la artritis reumatoide, consigue disminuir la gravedad de la enfermedad [148, 149]. Por otro lado, el uso de inhibidores de Ras en ratones MRL-*lpr* provoca una reducción en la hiperplasia de los órganos linfoides y en los niveles de auto-anticuerpos [150]. Aunque hay que tener en cuenta que tanto NF- κ B como ERK están implicados en funciones fisiológicas esenciales para el organismo [21], los datos presentados en esta Tesis indican que ciertas concentraciones de inhibidores pueden afectar de manera específica a las células T de memoria/activadas potencialmente auto-reactivas. Aunque es necesario un estudio más profundo, estos resultados podrían ser considerados en el desarrollo de terapias autoinmunes.

Anteriormente, se ha descrito que la estimulación de FAS conlleva la activación de las rutas de las MAPK y de NF- κ B en diferentes procesos relacionados con el crecimiento de neuritas [151], progresión de tumores [152], en progenitores de células del sistema nervioso [153], o en linfocitos de pacientes con ALPS y esplenocitos de ratones *lpr/gld* [154]. Aunque estos trabajos apuntan a un papel de FAS como inductor de las rutas de las MAPK y de NF- κ B, opuesto al que se propone en esta Tesis, estos estudios se han realizado con diferentes tipos celulares bajo condiciones de estimulación y análisis muy diversas. Concretamente, en el trabajo realizado con ratones *lpr* [154], se analizó la activación de NF- κ B en esplenocitos tratados con FAS-L tras una estimulación incompleta con anti-CD3 y una breve expansión con IL-2.

La activación de NF- κ B conduce a la transcripción de IL-2 [21]. Se detectó un aumento espontáneo en los marcadores de activación CD25 (cadena α del receptor de IL-2) y CD69 (lectina tipo-c) en las células T CD4⁺ de los ratones *lpr* (Fig. 7C), que podría ser el resultado de un encuentro reiterado entre células T auto-reactivas y auto-antígenos. Además, las células T CD4⁺ *lpr* muestran mayores niveles de CD25 que las células control durante una 3ª estimulación con conA + hrIL-2 (Fig. 7A).

3.2. Elevada producción de citoquinas pro-inflamatorias en las células T CD4⁺ *lpr* de memoria

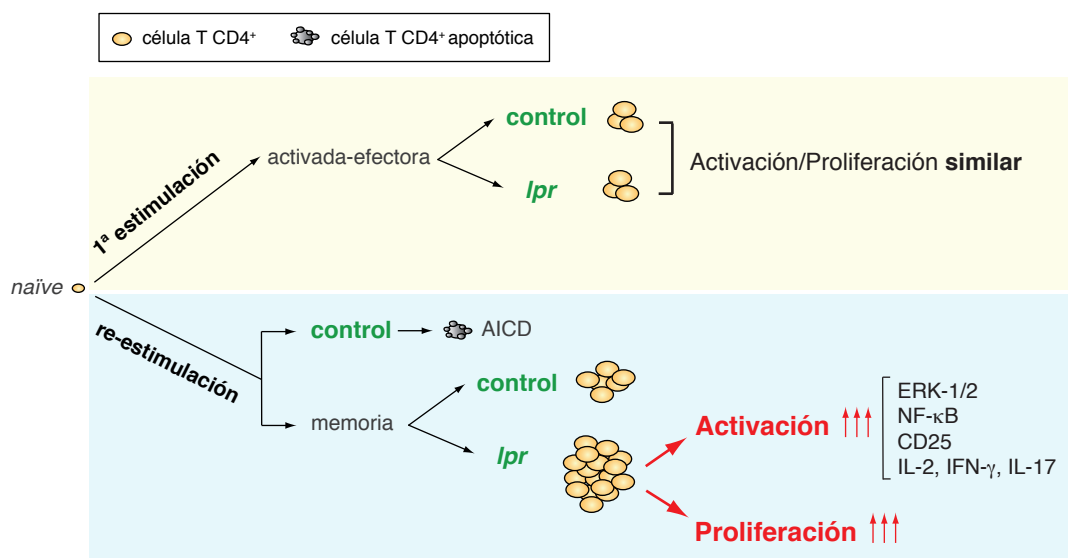
Se ha demostrado que la hiperproliferación de las células T CD4⁺ *lpr* durante una 3ª estimulación con conA + hrIL-2 se corresponde con una elevada producción de determinadas citoquinas pro-inflamatorias como IL-2, IFN- γ e IL-17 (Fig 7B). Todas estas citoquinas presentan un importante papel en el desarrollo de autoinmunidad [155, 156].

IL-2 promueve la respuesta inmune favoreciendo la proliferación, el aumento de moléculas anti-apoptóticas y la expresión de otras citoquinas pro-inflamatorias [157, 158]. No obstante, esta citoquina también tiene un papel inmunosupresor, ya que participa en la inducción de AICD y también está relacionada

con las células Treg (revisado en [155]). Esta citoquina ejerce un papel u otro dependiendo de múltiples circunstancias, por lo que se debe interpretar con cautela el aumento de IL-2 detectado en las células T *lpr* de memoria (Fig 7B). En relación con los resultados presentados en esta Tesis, se ha descrito que los niveles del receptor de IL-2 están aumentados en el suero de diferentes cepas de ratones con fenotipo similar al lupus [159].

IFN- γ juega un importante papel en los pacientes de LES, pues existe una correlación entre los niveles de esta citoquina y la actividad de la enfermedad [160]. Asimismo, los ratones MRL-*lpr* deficientes en IFN- γ muestran una notable reducción en los niveles de anticuerpos anti-ADN y en el desarrollo de glomerulonefritis [127]. Por lo tanto, la elevada producción de IFN- γ es requerida para el desarrollo de las manifestaciones patológicas del lupus.

Los niveles elevados de IL-17 se han asociado con el desarrollo de múltiples desórdenes autoinmunes tales como la esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), psoriasis, artritis reumatoide o diabetes entre otros (revisado en [156]). Además, se han detectado altos niveles de IL-17 en algunos casos de LES y existe una elevada presencia de células productoras de esta citoquina (DN, entre otras) en el riñón inflamado de estos pacientes [88, 161]. Se ha descrito que el incremento en la deposición de anticuerpos y en la activación del sistema de complemento detectado en los riñones de ratones con fenotipo similar al lupus, se asocia con IL-17 y IL-23 [162]. En base a estos datos, se ha propuesto que la inhibición farmacológica de IL-17 conduce a una mejora de la enfermedad de estos ratones [161].



Esquema 14. La ausencia de FAS provoca una hiperactivación e hiperproliferación de las células T CD4⁺ durante una estimulación repetida del TCR. Se ha representado el estado de activación/proliferación de las células T CD4⁺ control (C57BL/6) y *lpr* (C57BL/6-*lpr*) durante una estimulación primaria o repetida.

En conjunto, los presentados en esta Tesis sugieren que, durante una estimulación repetida el estado de activación de las células T CD4⁺ (ERK-1/2, NF- κ B, CD25 y citoquinas pro-inflamatorias) está restringi-

do por la presencia de FAS (esquema 14).

4. Implicación de FAS en la respuesta a antígenos de baja afinidad

Los ratones *lpr* presentan una pérdida de tolerancia que puede atribuirse a una alteración en la respuesta de las células T a antígenos propios [163] o ambientales. Los ratones deficientes en FAS utilizados en esta Tesis se encuentran en un ambiente libre de agentes patógenos. Además, se ha excluido la implicación de FAS en la respuesta a péptidos externos en varios estudios donde se ha demostrado que las células T *lpr* no muestran defectos en su reacción frente a infecciones víricas [164, 165].

Una de las posibles explicaciones para la pérdida de tolerancia de los ratones *lpr* podría relacionarse con una respuesta descontrolada de sus células T tras el reconocimiento de auto-antígenos. Las células T que reconocen al complejo antígeno/MHC con una afinidad muy alta son eliminadas en el timo mediante el proceso de selección negativa. En base a este hecho, se ha propuesto que la mayoría de las células T auto-reactivas que alcanzan la periferia reconocen antígenos endógenos para los que el TCR presenta una baja afinidad [123, 166](ver apartado 3.1. de la introducción). Por lo tanto se examinó si, además de la exposición repetida del antígeno, la afinidad del TCR por el péptido podría ser importante en la respuesta de las células T *lpr*.

Para comprobar si la elevada activación y proliferación detectada en las células T *lpr* podía relacionarse con una respuesta frente a antígenos propios, se analizó la respuesta de células T CD4⁺ control y *lpr* con un TCR transgénico específico para dos péptidos con alta (PCC) o baja (A96I) afinidad para el TCR. Al igual que ocurre durante una 1^a estimulación con conA + hr-IL2 (Fig. 4), no se detectaron diferencias significativas en la respuesta proliferativa primaria a PCC entre las células CD4⁺ TCRtg control y *lpr* (Fig. 14). No obstante, se detectó una hiperproliferación de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* respecto a las células control durante una re-estimulación con A96I *in vitro* en ausencia de apoptosis (Fig. 15B, C, D, E y 16B, C). Este resultado es muy relevante, pues corrobora la propuesta de que los auto-antígenos de baja afinidad son responsables de la respuesta autoinmune en los ratones *lpr*. Durante esta estimulación repetida también se detectó que la proliferación de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* en respuesta a PCC o A96I es mayor cuando el antígeno se presenta en concentraciones bajas (Fig. 15B, C). Este resultado apunta a un menor umbral de activación en las células T deficientes en FAS. Por otro lado, la diferencia en la capacidad de síntesis y de división entre las células CD4⁺ TCRtg control y *lpr*, es menor cuando éstas son estimuladas con PCC que con A96I (Fig. 15B, C, D, E). Este hecho podría deberse a que la estimulación con PCC es muy fuerte. De hecho, en experimentos realizados en nuestro laboratorio se ha comprobado que las células T CD4⁺ muestran una mayor proliferación cuando son estimuladas con PCC respecto a conA + hrIL-2 (datos no mostrados).

La ventaja proliferativa de las células CD4⁺ TCRtg deficientes en FAS durante una re-estimulación *in vitro* también se refleja en la población de células T CD4⁺ de memoria (CD44^{alto}), dentro de las cuales destaca la elevada capacidad de síntesis de las células de memoria/activadas (Fig. 15D).

Además, se comprobó que la hiperproliferación de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* depende de la activación de NF-κB, puesto que BAY 117082 disminuye específicamente la proliferación de las células T *lpr* potencialmente auto-reactivas, sin afectar a las células control (Fig. 17).

Por lo tanto, la hiperproliferación de las células CD4⁺ TCRtg *lpr* re-estimuladas con antígenos de baja afinidad *in vitro* sugiere un bajo umbral de activación en estas células. Este hecho haría más susceptibles a las células T deficientes en FAS a una estimulación eficaz frente a antígenos propios y a la pérdida de tolerancia. En relación con esta propuesta, en otro estudio diferente se ha asociado el menor umbral de activación a través del TCR de las células deficientes en Gadd45α con la auto-reactividad y el desarrollo de un fenotipo similar al lupus [34].

Para analizar la relevancia fisiológica de la hiperproliferación detectada en las células T CD4⁺ *lpr* re-estimuladas *in vitro* con antígenos de baja afinidad, se utilizaron dos modelos diferentes de estimulación de estimulaciones repetidas *in vivo*. Las células TCRtg control o *lpr* transferidas a ratones receptores se estimularon con DC + péptido (PCC o A96I) o con adyuvante (CFA/IFA) + péptido (PCC o A96I) (esquema 13, materiales y métodos). Aunque se desconoce si el proceso de AICD tiene lugar *in vivo* [45], para evitar posibles diferencias en la susceptibilidad apoptótica de las células T control y *lpr*, se estudió la proliferación de estas células en una 3ª estimulación *ex vivo*, en la que no hay inducción de apoptosis (Fig. 18). Después de una 2ª estimulación *in vivo* con PCC o A96I, en ambos modelos de estimulación las células CD4⁺ TCRtg *lpr* mostraron un incremento notable en el desarrollo del fenotipo de memoria (CD44^{alto}) (Fig. 19A). Asimismo, estas células deficientes en FAS mostraron una mayor proliferación que las células control durante una 3ª estimulación *ex vivo* con PCC o A96I (Fig. 19B). En estos modelos de estimulación *in vivo*, tanto los adyuvantes como las DC utilizadas provocan una hiperactivación generalizada del sistema inmune. Este efecto podría afectar a la respuesta de las células T CD4⁺ Vβ3⁺, impidiendo detectar diferencias en la estimulación con péptidos de alta o baja afinidad para el TCR. No obstante, esta aproximación revela que las células CD4⁺ TCRtg *lpr* presentan una elevada respuesta frente a antígenos de baja afinidad presentados tanto *in vitro* como *in vivo*.

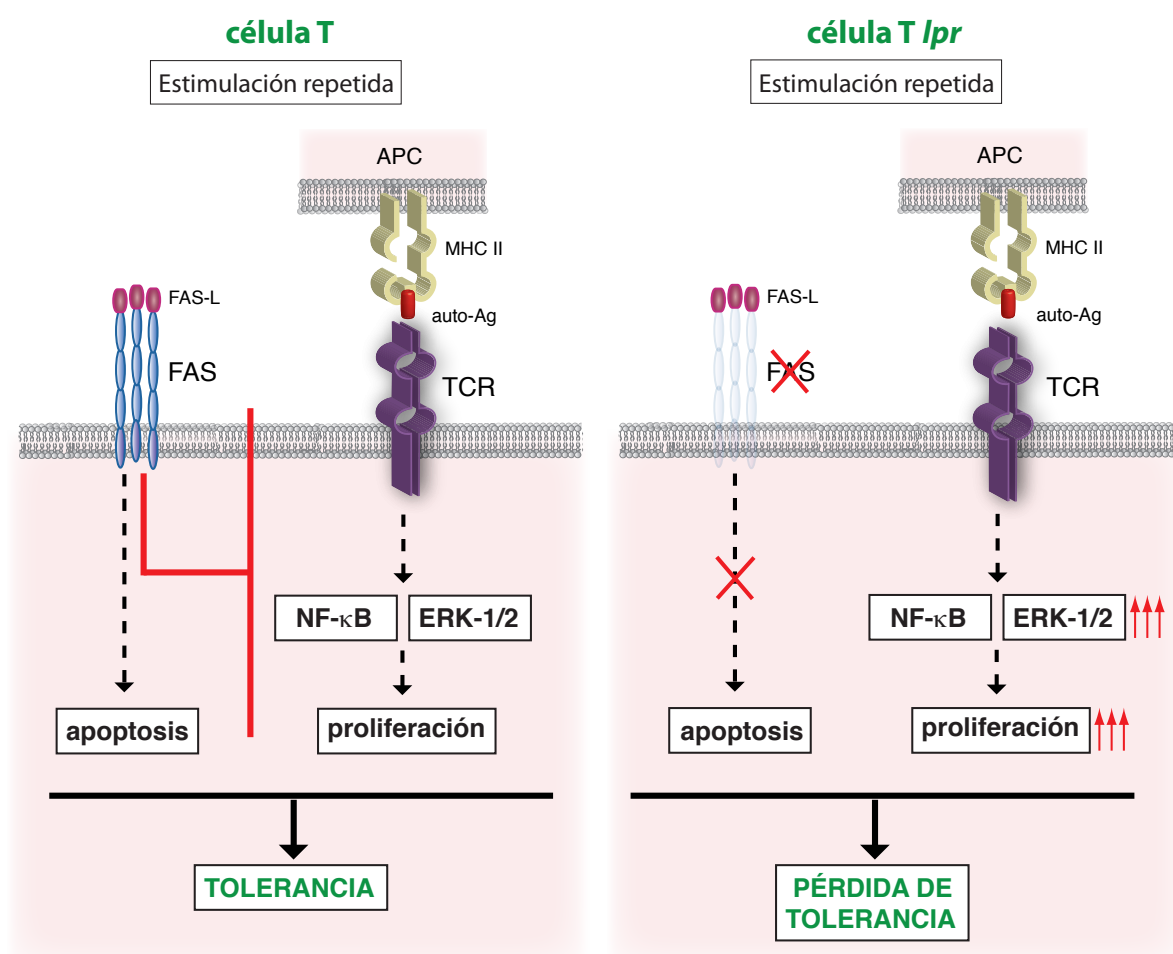
5. Modelo del papel ejercido por FAS en el establecimiento de tolerancia

Los resultados presentados en esta Tesis revelan que FAS, además de ejercer su conocido papel pro-apoptótico, también puede llevar a cabo una función anti-proliferativa en las células T durante una

re-estimulación con auto-antígenos de baja afinidad para el TCR. Anteriormente se ha implicado a otras moléculas pro-apoptóticas en la proliferación inducida tras la estimulación del TCR. De este modo, las células T deficientes en FADD o C-8 muestran defectos proliferativos [77-81] (ver apartado 4.2., introducción). Cabe destacar que FAS ejerce su papel como regulador negativo de la proliferación de manera específica en la población de células T de memoria, sin afectar a las células T *naïve*. En relación con esta observación, se ha descrito que p21 tiene una función alternativa al control del ciclo celular, en la que actúa como un inmunosupresor específico de las células T de memoria/efectoras, sin afectar a la proliferación de las células T *naïve* [36, 37]

Aunque en esta Tesis no se han estudiado los mecanismos moleculares que conducen a una mayor proliferación de las células T CD4⁺ *lpr* re-estimuladas, se ha detectado una destacada hiperactivación de NF- κ B y ERK-1/2 en estas células.

Los datos aquí presentados permiten concluir que, el balance entre la función pro-apoptótica de FAS y su papel anti-proliferativo es crucial para el establecimiento de tolerancia periférica (esquema 15).



Esquema 15. FAS regula negativamente la activación y proliferación de las células T durante una estimulación repetida.

En las células T deficientes en FAS (*lpr*) no hay inducción de apoptosis tras la presentación reiterada de un auto-antígeno y se produce una hiperactivación de NF- κ B y ERK-1/2 que conduce a una hiperproliferación de estas células y a la pérdida de tolerancia.

6. El control de la activación y proliferación de las células T *lpr* ejercido por p21 influye en el desarrollo de autoinmunidad

Se ha descrito en varios trabajos que p21 ejerce un importante papel en el mantenimiento de la tolerancia periférica. La ausencia de p21 conlleva al desarrollo espontáneo de un fenotipo similar al lupus relacionado con una excesiva proliferación de las células T p21^{-/-} de memoria/activadas [36, 37]. Asimismo, el papel de p21 como supresor de autoinmunidad ha sido reforzado en estudios en los que el tratamiento con análogos de p21 mostró un efecto terapéutico en el desarrollo de la enfermedad tipo lupus de ratones NZB X NZW [167]. También se ha descrito que las células T hiperproliferativas de pacientes con LES [85] presentan una disminución en los niveles de p21 y p27 [168]. Además, el tratamiento con FAS-L en las células T de pacientes con ALPS induce p21 [169]. Todos estos datos indican que, el estudio del papel de p21 en la respuesta inmune puede ayudar al desarrollo de terapias en enfermedades relacionadas con alteraciones inmunológicas.

Para estudiar la relevancia fisiológica de la hiperproliferación de las células T *lpr* en el desarrollo de la enfermedad autoinmune, se generaron ratones *lpr*-p21tg, que expresan p21 específicamente en las células T. Se consideró que la sobre-expresión de p21 en estos ratones podría reducir la excesiva proliferación de las células T *lpr* de memoria/activadas [36, 37]. Siguiendo este mismo argumento, se generaron ratones *lpr*-p21^{-/-}, en los que se esperaba detectar un aumento en la activación y proliferación de las células T de memoria/activadas en comparación con las células *lpr*.

6.1. La reducción de la proliferación de las células T *lpr* con el transgén de p21 disminuye la autoinmunidad

En los estudios realizados con los ratones *lpr*-p21tg, la expresión del transgén (Fig. 20A) consiguió reducir notablemente la proliferación de las células T CD4⁺, CD8⁺ y DN deficientes en FAS *in vivo* (Fig. 21-22A) e *in vitro* en las células T CD4⁺ estimuladas por 2ª vez con conA + hr-IL2 (Fig. 20B).

En esta Tesis se ha destacado el papel de las células T CD4⁺ de memoria, que hiperproliferan y se acumulan de manera espontánea en los ratones *lpr* (Fig. 3). La expresión del transgén de p21 en los ratones deficientes en FAS disminuye significativamente la acumulación y la proliferación de las células T CD4⁺ de memoria (Fig. 22B, C). Asimismo, las células T CD4⁺ CD44^{alto} CD62L⁻ *lpr*-p21tg muestran una notable reducción en la producción de IL-17 e IFN- γ respecto a los ratones *lpr* (Fig. 22D). También se detectó un significativo descenso en la producción de estas citoquinas en las células T DN *lpr*-p21tg en comparación con los ratones *lpr* (Fig. 21B). En relación con este resultado, se ha descrito que las células T DN de pacientes de LES presentan una elevada producción de IL-17, asociada al desarrollo de glomerulonefritis [88].

La linfadenopatía y los altos niveles de auto-anticuerpos característicos de los ratones C57BL/6-*lpr* se redujeron notablemente en los ratones *lpr*-p21tg como consecuencia de la disminución en la proliferación de las células T de estos ratones (Fig. 21D, 23A).

Asimismo, la expresión de p21 en las células T disminuyó de forma significativa la severa enfermedad autoinmune de los ratones MRL-*lpr*, resultante de la combinación de un fenotipo pro-autoinmune y la mutación *lpr* [65]. De este modo, la expresión del transgén de p21 en los ratones MRL-*lpr* redujo notablemente el desarrollo de glomerulonefritis y la alta incidencia de mortalidad característica de estos ratones (Fig. 23B, 24).

Aunque la sobre-expresión de p21 en los ratones deficientes en FAS conlleva una notable mejoría de su enfermedad, los ratones *lpr*-p21tg no muestran una reversión total del fenotipo autoinmune. Este hecho parece indicar que, aunque las células T juegan un papel esencial en el desarrollo de autoinmunidad de los ratones *lpr*, otros tipos celulares también podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad. De este modo, se ha descrito que la ausencia de FAS en las células T, B o DC es suficiente para romper la auto-tolerancia [170].

Cabe destacar que las células T p21tg no presentan ninguna alteración significativa en la proliferación respecto a las células T control (Fig. 21A, 22). Este hecho indica que el efecto de p21 como regulador negativo de la proliferación parece específico para la población de células T potencialmente auto-reactivas de los ratones *lpr* (Fig. 21, 22). Por lo tanto, los datos presentados en esta Tesis revelan que la regulación de la proliferación de las células T *lpr* es esencial para el control del desarrollo de autoinmunidad. Asimismo, estos resultados podrían contribuir al desarrollo de nuevos enfoques en el diseño de estrategias terapéuticas orientadas a disminuir la proliferación de las células T en enfermedades autoinmunes.

6.2. La falta de p21 exacerba la enfermedad autoinmune de los ratones *lpr*

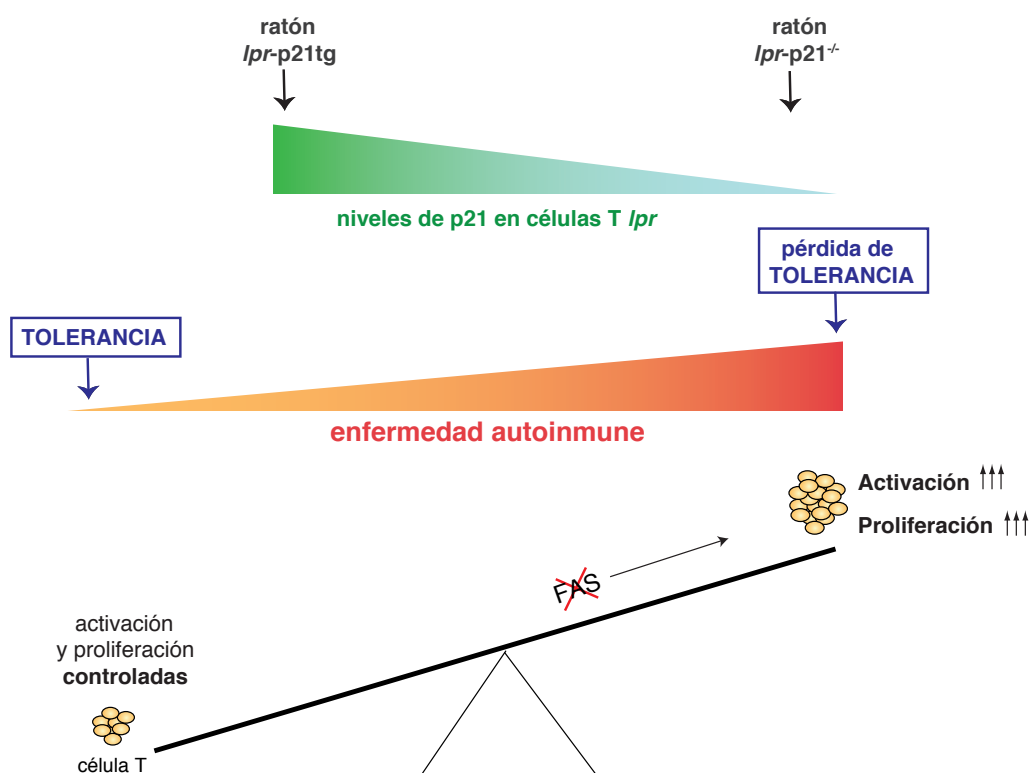
Para definir mejor el papel de p21 en la proliferación de las células T *lpr* y el desarrollo de autoinmunidad se generaron ratones *lpr*-p21^{-/-}. En este modelo murino, la falta de FAS y p21 tiene un efecto aditivo en el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

Tras analizar las diferentes poblaciones de células T, se detectó una hiperactivación *in vivo* de las células T CD4⁺ en los ratones *lpr*-p21^{-/-}, y una mayor activación/proliferación de estas mismas células durante una re-estimulación *in vitro*, respecto a los ratones *lpr* (Fig. 25-27). Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia significativa en la acumulación de células T DN ni en la linfadenopatía desarrollada por los ratones *lpr*-p21^{-/-} respecto a los ratones *lpr* (datos no mostrados). Una explicación para este hecho podría ser que la población de células T DN *lpr* no expresa p21 (datos no mostrados). Por otro lado, se detectó en los ratones *lpr*-p21^{-/-} una excesiva acumulación de células T CD4⁺ de memoria/activadas productoras

de elevados niveles de IL-2, IL-17 e IFN- γ *in vitro* e IL-17 *in vivo* (Fig. 25C y 27B, C). La expansión de la población de células T de memoria es una característica común en diversos modelos de autoinmunidad [33, 37, 171]. Dado que no se detectaron diferencias en la acumulación/proliferación de las células T DN y T CD8⁺ de memoria entre los ratones *lpr* y *lpr-p21^{-/-}*, la hiperactivación detectada en las células T CD4⁺ de memoria/activadas *lpr-p21^{-/-}* podría ser responsable de la severa enfermedad autoinmune desarrollada por estos ratones doble deficientes (Fig. 28), que finalmente conduce a su muerte (Fig. 29).

En concordancia con los datos anteriores, se han descrito otros modelos murinos donde la activación incontrolada de las células T conlleva una pérdida de tolerancia frente a antígenos propios y el desarrollo de autoinmunidad. Este es el caso de los ratones deficientes en PD-1, un inhibidor de la señalización del TCR, o CTLA-4, un inhibidor de la co-estimulación de las células T, que muestran un fenotipo similar al lupus [32, 85, 116, 172, 173].

En conjunto, los datos obtenidos con los ratones *lpr-p21tg* y *lpr-p21^{-/-}* revelan que el control de la activación/proliferación de las células T ejercido por FAS y p21 es esencial para el mantenimiento de la tolerancia periférica (esquema 16).



Esquema 16. Papel de FAS y p21 en el mantenimiento de tolerancia. La pérdida de tolerancia periférica conduce a la aparición de la enfermedad autoinmune (glomerulonefritis, auto-anticuerpos) y se relaciona con altos niveles de activación y proliferación de las células T. Cabe mencionar que la activación y proliferación de las células T *lpr* se puede controlar modificando los niveles de p21.

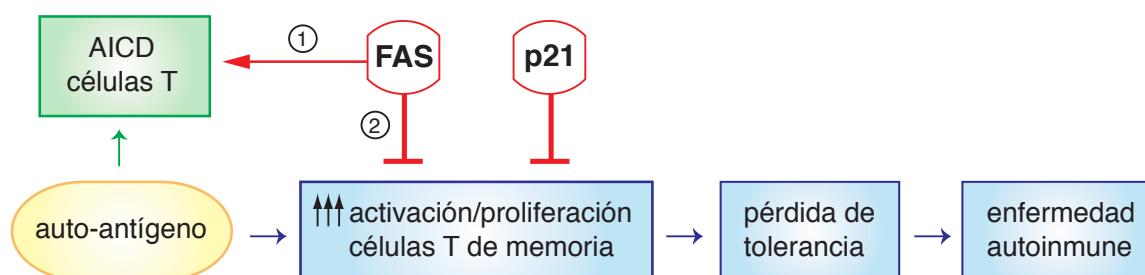
7. Conclusión final

El sistema inmune tiene la capacidad de mantener un estado de homeostasis a pesar de encontrarse frecuentemente con agentes externos y estar expuesto de manera continua a antígenos propios. Para evitar la alteración de esta homeostasis y la consecuente aparición de enfermedades, los procesos de muerte, activación y proliferación de las células T deben estar rigurosamente controlados.

En el organismo se generan de manera continua linfocitos T auto-reactivos. La mayoría de los antígenos endógenos presentan una baja afinidad para el TCR de estos linfocitos y suelen estar ampliamente distribuidos por el organismo, lo que facilita su encuentro reiterado. En esta Tesis se propone que FAS actúa como un regulador negativo de la proliferación de las células T estimuladas reiteradamente con antígenos de baja afinidad. La importancia biológica de esta novedosa función de FAS queda definida en los experimentos de estimulaciones repetidas *in vivo*. Cabe destacar que, durante una re-estimulación las células T CD4⁺ adquieren un fenotipo de memoria (CD44^{alto}). Además, se ha demostrado que FAS reprime la expansión de esta población de células T de memoria, así como la activación de NF-κB y ERK-1/2 en estas células. Por lo tanto, los datos de esta Tesis revelan que FAS tiene un doble papel, ya que además de ejercer su conocida función anti-apoptótica, también está implicado en el control de la activación y proliferación de las células T de memoria.

La relevancia fisiológica de la activación/proliferación de las células T en la pérdida de tolerancia y el desarrollo de autoinmunidad, queda reflejada en los estudios realizados con los ratones *lpr*-p21tg y *lpr*-p21^{-/-}. En estos modelos murinos, se ha demostrado que la elevada activación/proliferación de las células T *lpr* se reduce al aumentar los niveles de p21, limitando el desarrollo de autoinmunidad. Asimismo, la ausencia de p21 provoca una excesiva activación y acumulación de células T *lpr* de memoria, responsables del aumento en la severidad de la enfermedad autoinmune.

Las observaciones recogidas en esta Tesis revelan un papel esencial de FAS y de p21 en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica (esquema 17).



Esquema 17. Control de la homeostasis inmunológica ejercido por FAS y p21. Durante el encuentro reiterado de un auto-antígeno, FAS ejerce un doble papel participando no sólo en la muerte celular inducida por activación (AICD) (1), si no también en el control de la activación/proliferación de las células T de memoria (2) junto con p21. Si se produce una activación/proliferación descontrolada de las células T de memoria, como consecuencia se pierde la tolerancia y se desarrolla la enfermedad autoinmune.

CONCLUSIONES

**“El que se pierde es el que encuentra las
nuevas sendas”**

Nils Kjaer. Escritor noruego (1870-1924).

EAS

hiperactivación

hiperproliferación

naïve

memoria

in vivo

in vitro

tolerancia

homeostasis

Los resultados obtenidos en estas Tesis han dado lugar a las siguientes conclusiones:

- 1 FAS ejerce un papel fundamental en el control de la proliferación de las células T CD4⁺ de memoria *in vivo* y durante una estimulación repetida *in vitro*, sin afectar a las células *naïve*. Esta novedosa función de FAS es independiente de su papel pro-apoptótico.
- 2 La hiperproliferación de las células T CD4⁺ de memoria deficientes en FAS, *lpr*, está asociada a una hiperactivación de NF- κ B, ERK-1/2, altos niveles de CD25 y a una elevada producción de citoquinas pro-inflamatorias.
- 3 Las células T CD4⁺ *lpr* hiperproliferan en respuesta a una estimulación repetida con un antígeno específico de baja afinidad para el TCR. Este fenómeno revela la susceptibilidad de las células T *lpr* a la estimulación frente a antígenos propios y a la pérdida de tolerancia.
- 4 El efecto de FAS como regulador negativo de la respuesta de las células T es fisiológicamente relevante, dado que las células T *lpr* muestran una elevada proliferación después de una re-estimulación *in vivo*.
- 5 Los niveles de activación/proliferación de las células T *lpr* son regulados específicamente por p21 y determinan el desarrollo de la enfermedad autoinmune asociada a la falta de FAS.
- 6 Tanto FAS como p21 ejercen un importante papel en el control de la activación y proliferación de las células T de memoria, que es esencial para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y el establecimiento de tolerancia periférica.

BIBLIOGRAFÍA

**“Según vamos adquiriendo conocimiento,
las cosas no se hacen más comprensibles,
sino más misteriosas.**

Albert Schweitzer. Filósofo, médico y escritor alemán

Abbas AK

Sprent J

Balomenos D

Nagata S

Dooms H

Tsokos G

Strasser A

Jenkins MK

Peter ME

Swain S

1. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S33-40.
2. Swain, S.L., et al., *From naive to memory T cells*. Immunol Rev, 1996. **150**: p. 143-67.
3. Dutton, R.W., L.M. Bradley, and S.L. Swain, *T cell memory*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 201-23.
4. Vikstrom, I. and D.M. Tarlinton, *B cell memory and the role of apoptosis in its formation*. Mol Immunol, 2011. **48**(11): p. 1301-6.
5. London, C.A., M.P. Lodge, and A.K. Abbas, *Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 265-72.
6. Ahmadzadeh, M., S.F. Hussain, and D.L. Farber, *Effector CD4 T cells are biochemically distinct from the memory subset: evidence for long-term persistence of effectors in vivo*. J Immunol, 1999. **163**(6): p. 3053-63.
7. Kishimoto, T.K., M.A. Jutila, and E.C. Butcher, *Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(6): p. 2244-8.
8. Jelley-Gibbs, D.M., et al., *Influencing the fates of CD4 T cells on the path to memory: lessons from influenza*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(4): p. 343-52.
9. Rudolph, M.G., R.L. Stanfield, and I.A. Wilson, *How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 419-66.
10. Chao, C.C., R. Jensen, and M.O. Dailey, *Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells*. J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1686-94.
11. Rudd, C.E., A. Taylor, and H. Schneider, *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 12-26.
12. Zamoyska, R., et al., *The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation*. Immunol Rev, 2003. **191**: p. 107-18.
13. Dustin, M.L., *A dynamic view of the immunological synapse*. Semin Immunol, 2005. **17**(6): p. 400-10.
14. Buckler, J.L., X. Liu, and L.A. Turka, *Regulation of T-cell responses by PTEN*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 239-48.
15. Isakov, N. and A. Altman, *Protein kinase C(theta) in T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 761-94.
16. Gallo, E.M., K. Cante-Barrett, and G.R. Crabtree, *Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 25-32.

17. Mor, A. and M.R. Philips, *Compartmentalized Ras/MAPK signaling*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 771-800.
18. Mor, A., M.R. Philips, and M.H. Pillinger, *The role of Ras signaling in lupus T lymphocytes: biology and pathogenesis*. Clin Immunol, 2007. **125**(3): p. 215-23.
19. Gillis, S., et al., *T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity*. J Immunol, 1978. **120**(6): p. 2027-32.
20. Dong, C., R.J. Davis, and R.A. Flavell, *MAP kinases in the immune response*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 55-72.
21. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.
22. Rincon, M., R.A. Flavell, and R.A. Davis, *The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(9): p. 1328-37.
23. Ruland, J. and T.W. Mak, *Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB*. Immunol Rev, 2003. **193**: p. 93-100.
24. Weil, R. and A. Israel, *Deciphering the pathway from the TCR to NF-kappaB*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 826-33.
25. Cheng, J., A. Montecalvo, and L.P. Kane, *Regulation of NF-kappaB induction by TCR/CD28*. Immunol Res, 2011. **50**(2-3): p. 113-7.
26. Shambharkar, P.B., et al., *Phosphorylation and ubiquitination of the IkappaB kinase complex by two distinct signaling pathways*. EMBO J, 2007. **26**(7): p. 1794-805.
27. Abbas, A.K., *The control of T cell activation vs. tolerance*. Autoimmun Rev, 2003. **2**(3): p. 115-8.
28. Metzger, T.C. and M.S. Anderson, *Control of central and peripheral tolerance by Aire*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 89-103.
29. Lohr, J., et al., *T-cell tolerance and autoimmunity to systemic and tissue-restricted self-antigens*. Immunol Rev, 2005. **204**: p. 116-27.
30. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 305-34.
31. Paterson, A.M. and A.H. Sharpe, *Taming tissue-specific T cells: CTLA-4 reins in self-reactive T cells*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 109-11.
32. Okazaki, T. and T. Honjo, *The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance*. Trends Immunol, 2006. **27**(4): p. 195-201.
33. Murga, M., et al., *Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 959-70.
34. Salvador, J.M., et al., *Mice lacking the p53-effector gene Gadd45a develop a lupus-like syndro-*

- me. *Immunity*, 2002. **16**(4): p. 499-508.
35. Liu, L., et al., *Gadd45 beta and Gadd45 gamma are critical for regulating autoimmunity*. *J Exp Med*, 2005. **202**(10): p. 1341-7.
 36. Balomenos, D., et al., *The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development*. *Nat Med*, 2000. **6**(2): p. 171-6.
 37. Arias, C.F., et al., *p21CIP1/WAF1 controls proliferation of activated/memory T cells and affects homeostasis and memory T cell responses*. *J Immunol*, 2007. **178**(4): p. 2296-306.
 38. Trakala, M., et al., *Regulation of macrophage activation and septic shock susceptibility via p21(WAF1/CIP1)*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(3): p. 810-9.
 39. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas, *Natural versus adaptive regulatory T cells*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(3): p. 253-7.
 40. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 523-32.
 41. Green, D.R., N. Droin, and M. Pinkoski, *Activation-induced cell death in T cells*. *Immunol Rev*, 2003. **193**: p. 70-81.
 42. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. *Science*, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
 43. Lenardo, M.J., *Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis*. *Nature*, 1991. **353**(6347): p. 858-61.
 44. Lenardo, M., et al., *Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 221-53.
 45. Walker, L.S. and A.K. Abbas, *The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(1): p. 11-9.
 46. Singer, G.G. and A.K. Abbas, *The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice*. *Immunity*, 1994. **1**(5): p. 365-71.
 47. Mogil, R.J., et al., *Fas (CD95) participates in peripheral T cell deletion and associated apoptosis in vivo*. *Int Immunol*, 1995. **7**(9): p. 1451-8.
 48. Ettinger, R., et al., *Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4+ T cells responding to a bacterial superantigen*. *J Immunol*, 1995. **154**(9): p. 4302-8.
 49. Renno, T., et al., *Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand*. *J Exp Med*, 1996. **183**(2): p. 431-7.
 50. Krueger, A., et al., *The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis*. *Immunol Rev*, 2003. **193**: p. 58-69.

51. Kumar, S., *Caspase function in programmed cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 32-43.
52. Siegel, R.M., et al., *SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane*. J Cell Biol, 2004. **167**(4): p. 735-44.
53. Arnold, R., et al., *How T lymphocytes switch between life and death*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1654-8.
54. Barnhart, B.C., E.C. Alappat, and M.E. Peter, *The CD95 type I/type II model*. Semin Immunol, 2003. **15**(3): p. 185-93.
55. Budd, R.C., W.C. Yeh, and J. Tschopp, *cFLIP regulation of lymphocyte activation and development*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 196-204.
56. Yang, Y., et al., *Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1673-82.
57. Park, C.G., et al., *A novel gene product that couples TCR signaling to Fas(CD95) expression in activation-induced cell death*. Immunity, 1996. **4**(6): p. 583-91.
58. Pinkoski, M.J., et al., *Nonlymphoid Fas ligand in peptide-induced peripheral lymphocyte deletion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16174-9.
59. Li-Weber, M. and P.H. Krammer, *Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system*. Semin Immunol, 2003. **15**(3): p. 145-57.
60. Zheng, L., et al., *T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 763-9.
61. Watanabe-Fukunaga, R., et al., *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis*. Nature, 1992. **356**(6367): p. 314-7.
62. Singer, G.G., et al., *Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(6): p. 913-20.
63. Shivakumar, S., G.C. Tsokos, and S.K. Datta, *T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis*. J Immunol, 1989. **143**(1): p. 103-12.
64. Kimberly, R.P., *Immune complexes in the rheumatic diseases*. Rheum Dis Clin North Am, 1987. **13**(3): p. 583-96.
65. Vidal, S., D.H. Kono, and A.N. Theofilopoulos, *Loci predisposing to autoimmunity in MRL-Fas lpr and C57BL/6-Faslpr mice*. J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 696-702.
66. Balomenos, D., R. Rumold, and A.N. Theofilopoulos, *The proliferative in vivo activities of lpr dou-*

- ble-negative T cells and the primary role of p59fyn in their activation and expansion.* J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2265-73.
67. Fortner, K.A. and R.C. Budd, *The death receptor Fas (CD95/APO-1) mediates the deletion of T lymphocytes undergoing homeostatic proliferation.* J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4374-82.
 68. Ramsdell, F., et al., *gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas.* Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 928-33.
 69. Kimura, M. and A. Matsuzawa, *Autoimmunity in mice bearing lprcg: a novel mutant gene.* Int Rev Immunol, 1994. **11**(3): p. 193-210.
 70. Yeh, W.C., et al., *FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis.* Science, 1998. **279**(5358): p. 1954-8.
 71. Busso, D., et al., *Life-giving caspases: revealing new roles during mouse embryo preimplantation development.* Int J Dev Biol, 2010. **54**(5): p. 857-65.
 72. Newton, K., et al., *A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of auto-reactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes.* EMBO J, 1998. **17**(3): p. 706-18.
 73. Smith, K.G., A. Strasser, and D.L. Vaux, *CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease.* EMBO J, 1996. **15**(19): p. 5167-76.
 74. Salmena, L., et al., *Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity.* Genes Dev, 2003. **17**(7): p. 883-95.
 75. Walsh, C.M., et al., *A role for FADD in T cell activation and development.* Immunity, 1998. **8**(4): p. 439-49.
 76. Strasser, A. and K. Newton, *FADD/MORT1, a signal transducer that can promote cell death or cell growth.* Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(5): p. 533-7.
 77. Newton, K., et al., *Effects of a dominant interfering mutant of FADD on signal transduction in activated T cells.* Curr Biol, 2001. **11**(4): p. 273-6.
 78. Mack, A. and G. Hacker, *Inhibition of caspase or FADD function blocks proliferation but not MAP kinase-activation and interleukin-2-production during primary stimulation of T cells.* Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 1986-92.
 79. Zhang, J., et al., *Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1.* Nature, 1998. **392**(6673): p. 296-300.
 80. Chun, H.J., et al., *Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency.* Nature, 2002. **419**(6905): p. 395-9.

81. Kennedy, N.J., et al., *Caspase activation is required for T cell proliferation*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1891-6.
82. Tsokos, G.C., *Systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2011. **365**(22): p. 2110-21.
83. Bidere, N., H.C. Su, and M.J. Lenardo, *Genetic disorders of programmed cell death in the immune system*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 321-52.
84. Moser, K.L., et al., *Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus*. Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 373-9.
85. Jury, E.C., et al., *Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus*. Eur J Immunol, 2010. **40**(2): p. 569-78.
86. Crispin, J.C., et al., *Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances*. Trends Mol Med, 2010. **16**(2): p. 47-57.
87. Kong, P.L., et al., *Intrinsic T cell defects in systemic autoimmunity*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **987**: p. 60-7.
88. Crispin, J.C., et al., *Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8761-6.
89. Nagata, S., *Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model*. J Hum Genet, 1998. **43**(1): p. 2-8.
90. Oliveira, J.B., et al., *Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop*. Blood, 2010. **116**(14): p. e35-40.
91. Vidal, A. and A. Koff, *Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause*. Gene, 2000. **247**(1-2): p. 1-15.
92. Wells, A.D., *Cyclin-dependent kinases: molecular switches controlling anergy and potential therapeutic targets for tolerance*. Semin Immunol, 2007. **19**(3): p. 173-9.
93. Dotto, G.P., *p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?* Biochim Biophys Acta, 2000. **1471**(1): p. M43-56.
94. Li, L., et al., *A pathway regulated by cell cycle inhibitor p27Kip1 and checkpoint inhibitor Smad3 is involved in the induction of T cell tolerance*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1157-65.
95. Rowell, E.A., et al., *The cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 is required for transplantation tolerance induced by costimulatory blockade*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5169-76.
96. Rowell, E.A., M.C. Walsh, and A.D. Wells, *Opposing roles for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in the control of CD4+ T cell proliferation and effector function*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3359-68.

97. Zhang, S., V.A. Lawless, and M.H. Kaplan, *Cytokine-stimulated T lymphocyte proliferation is regulated by p27Kip1*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6270-7.
98. Balomenos, D. and A.C. Martinez, *Cell-cycle regulation in immunity, tolerance and autoimmunity*. Immunol Today, 2000. **21**(11): p. 551-5.
99. Le Deist, F., et al., *Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions*. Lancet, 1996. **348**(9029): p. 719-23.
100. Lim, M.S., et al., *Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome*. Am J Pathol, 1998. **153**(5): p. 1541-50.
101. Fotedar, R., et al., *Effect of p21waf1/cip1 transgene on radiation induced apoptosis in T cells*. Oncogene, 1999. **18**(24): p. 3652-8.
102. Kaye, J., et al., *Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor*. Nature, 1989. **341**(6244): p. 746-9.
103. Seder, R.A., et al., *The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice*. J Exp Med, 1992. **176**(4): p. 1091-8.
104. Dooms, H., et al., *Interleukin-2 enhances CD4+ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 547-57.
105. Slee, E.A., et al., *Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32*. Biochem J, 1996. **315** (Pt 1): p. 21-4.
106. Favata, M.F., et al., *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18623-32.
107. Hernandez, A., et al., *Inhibition of NF-kappa B during human dendritic cell differentiation generates anergy and regulatory T-cell activity for one but not two human leukocyte antigen DR mismatches*. Hum Immunol, 2007. **68**(9): p. 715-29.
108. Sprent, J. and C.D. Surh, *T cell memory*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 551-79.
109. Page, D.M., et al., *Negative selection of CD4+ CD8+ thymocytes by T-cell receptor peptide antagonists*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 4057-61.
110. Vratsanos, G.S., et al., *CD4(+) T cells from lupus-prone mice are hyperresponsive to T cell receptor engagement with low and high affinity peptide antigens: a model to explain spontaneous T cell activation in lupus*. J Exp Med, 2001. **193**(3): p. 329-37.
111. Quah, B.J., H.S. Warren, and C.R. Parish, *Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*. Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2049-56.

112. Tough, D.F. and J. Sprent, *Turnover of naive- and memory-phenotype T cells*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1127-35.
113. Berden, J.H., et al., *Analysis of vascular lesions in murine SLE. I. Association with serologic abnormalities*. J Immunol, 1983. **130**(4): p. 1699-705.
114. Giese, T. and W.F. Davidson, *Chronic treatment of C3H-lpr/lpr and C3H-gld/gld mice with anti-CD8 monoclonal antibody prevents the accumulation of double negative T cells but not autoantibody production*. J Immunol, 1994. **152**(4): p. 2000-10.
115. Maldonado, M.A., et al., *Greatly reduced lymphoproliferation in lpr mice lacking major histocompatibility complex class I*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 641-8.
116. Tivol, E.A., et al., *Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4*. Immunity, 1995. **3**(5): p. 541-7.
117. Waterhouse, P., et al., *Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4*. Science, 1995. **270**(5238): p. 985-8.
118. Willerford, D.M., et al., *Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment*. Immunity, 1995. **3**(4): p. 521-30.
119. Nurieva, R.I., X. Liu, and C. Dong, *Molecular mechanisms of T-cell tolerance*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 133-44.
120. Alderson, M.R., et al., *Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2231-5.
121. Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, and A. Rao, *Partners in transcription: NFAT and AP-1*. Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2476-89.
122. Pape, K.A., et al., *Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo*. Immunol Rev, 1997. **156**: p. 67-78.
123. Choi, J.Y. and J. Craft, *Activation of naive CD4+ T cells in vivo by a self-peptide mimic: mechanism of tolerance maintenance and preservation of immunity*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7399-407.
124. Jenkins, M.K., et al., *In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 23-45.
125. Dresser, D.W., *Effectiveness of lipid and lipidophilic substances as adjuvants*. Nature, 1961. **191**: p. 1169-71.
126. Takahashi, S., et al., *Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice*. J Clin Invest, 1996. **97**(7): p. 1597-604.
127. Balomenos, D., R. Rumold, and A.N. Theofilopoulos, *Interferon-gamma is required for lupus-like*

- disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice.* J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 364-71.
128. Saxena, R., T. Mahajan, and C. Mohan, *Lupus nephritis: current update.* Arthritis Res Ther, 2011. **13**(5): p. 240.
 129. Adachi, M., et al., *Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver.* Nat Genet, 1995. **11**(3): p. 294-300.
 130. Nagata, S. and P. Golstein, *The Fas death factor.* Science, 1995. **267**(5203): p. 1449-56.
 131. Ju, S.T., et al., *Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation.* Nature, 1995. **373**(6513): p. 444-8.
 132. Russell, J.H., et al., *Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4409-13.
 133. Green, D.R., *Fas Bim boom!* Immunity, 2008. **28**(2): p. 141-3.
 134. Strasser, A. and M. Pellegrini, *T-lymphocyte death during shutdown of an immune response.* Trends Immunol, 2004. **25**(11): p. 610-5.
 135. Davey, G.M., et al., *Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim.* J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 947-55.
 136. Peter, M.E., et al., *The CD95 receptor: apoptosis revisited.* Cell, 2007. **129**(3): p. 447-50.
 137. Jevnikar, A.M., M.J. Grusby, and L.H. Glimcher, *Prevention of nephritis in major histocompatibility complex class II-deficient MRL-lpr mice.* J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1137-43.
 138. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
 139. Cho, Y.G., et al., *Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis.* Autoimmun Rev, 2007. **7**(1): p. 65-70.
 140. Sun, M., et al., *The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals.* J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1481-91.
 141. Strauss, G., et al., *CD95 co-stimulation blocks activation of naive T cells by inhibiting T cell receptor signaling.* J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1379-93.
 142. Desbarats, J., et al., *Dichotomy between naive and memory CD4(+) T cell responses to Fas engagement.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8104-9.
 143. Rogers, P.R., C. Dubey, and S.L. Swain, *Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen.* J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2338-46.
 144. Croft, M., L.M. Bradley, and S.L. Swain, *Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many anti-*

- gen-presenting cell types including resting B cells.* J Immunol, 1994. **152**(6): p. 2675-85.
145. Pearce, E.L. and H. Shen, *Making sense of inflammation, epigenetics, and memory CD8+ T-cell differentiation in the context of infection.* Immunol Rev, 2006. **211**: p. 197-202.
 146. Farber, D.L., *Biochemical signaling pathways for memory T cell recall.* Semin Immunol, 2009. **21**(2): p. 84-91.
 147. Oliveira, J.B., et al., *NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 8953-8.
 148. Pierce, J.W., et al., *Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo.* J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 21096-103.
 149. Kubota, T., et al., *NF-kappaB inhibitor dehydroxymethylepoxyquinomicin suppresses osteoclastogenesis and expression of NFATc1 in mouse arthritis without affecting expression of RANKL, osteoprotegerin or macrophage colony-stimulating factor.* Arthritis Res Ther, 2007. **9**(5): p. R97.
 150. Katzav, A., et al., *Treatment of MRL/lpr mice, a genetic autoimmune model, with the Ras inhibitor, farnesylthiosalicylate (FTS).* Clin Exp Immunol, 2001. **126**(3): p. 570-7.
 151. Desbarats, J., et al., *Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(2): p. 118-25.
 152. Barnhart, B.C., et al., *CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells.* EMBO J, 2004. **23**(15): p. 3175-85.
 153. Tamm, C., et al., *Differential regulation of the mitochondrial and death receptor pathways in neural stem cells.* Eur J Neurosci, 2004. **19**(10): p. 2613-21.
 154. Legembre, P., et al., *Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signalling thresholds.* EMBO Rep, 2004. **5**(11): p. 1084-9.
 155. O'Shea, J.J., A. Ma, and P. Lipsky, *Cytokines and autoimmunity.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 37-45.
 156. Hemdan, N.Y., et al., *Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity.* Autoimmun Rev, 2010. **9**(11): p. 785-92.
 157. Gillis, S., A.E. Gillis, and C.S. Henney, *Monoclonal antibody directed against interleukin 2. I. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis and the in vitro differentiation of alloreactive cytolytic T cells.* J Exp Med, 1981. **154**(3): p. 983-8.
 158. Malek, T.R., et al., *The murine IL 2 receptor. II. Monoclonal anti-IL 2 receptor antibodies as specific inhibitors of T cell function in vitro.* J Immunol, 1984. **133**(4): p. 1976-82.
 159. Balderas, R.S., et al., *Elevated titers of cell-free interleukin 2 receptor in serum of lupus mice.* J

- Immunol, 1987. **139**(5): p. 1496-500.
160. Hayashi, T., *Therapeutic strategies for SLE involving cytokines: mechanism-oriented therapies especially IFN-gamma targeting gene therapy*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**.
 161. Apostolidis, S.A., J.C. Crispin, and G.C. Tsokos, *IL-17-producing T cells in lupus nephritis*. Lupus, 2011. **20**(2): p. 120-4.
 162. Zhang, Z., V.C. Kytтарis, and G.C. Tsokos, *The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis*. J Immunol, 2009. **183**(5): p. 3160-9.
 163. Fortner, K.A., et al., *Fas (CD95/APO-1) limits the expansion of T lymphocytes in an environment of limited T-cell antigen receptor/MHC contacts*. Int Immunol, 2011. **23**(2): p. 75-88.
 164. Reich, A., et al., *Immune down-regulation and peripheral deletion of CD8 T cells does not require TNF receptor-ligand interactions nor CD95 (Fas, APO-1)*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 678-82.
 165. Lohman, B.L., E.S. Razvi, and R.M. Welsh, *T-lymphocyte downregulation after acute viral infection is not dependent on CD95 (Fas) receptor-ligand interactions*. J Virol, 1996. **70**(11): p. 8199-203.
 166. Lucas, B., et al., *Divergent changes in the sensitivity of maturing T cells to structurally related ligands underlies formation of a useful T cell repertoire*. Immunity, 1999. **10**(3): p. 367-76.
 167. Goulvestre, C., et al., *A mimic of p21WAF1/CIP1 ameliorates murine lupus*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6959-67.
 168. Tang, H., et al., *Abnormal activation of the Akt-GSK3beta signaling pathway in peripheral blood T cells from patients with systemic lupus erythematosus*. Cell Cycle, 2009. **8**(17): p. 2789-93.
 169. Bosque, A., et al., *Cell cycle regulation by FasL and Apo2L/TRAIL in human T-cell blasts. Implications for autoimmune lymphoproliferative syndromes*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(2): p. 488-98.
 170. Stranges, P.B., et al., *Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 629-41.
 171. Gupta, V.A., et al., *B cells drive lymphocyte activation and expansion in mice with the CD45 wedge mutation and Fas deficiency*. J Exp Med, 2008. **205**(12): p. 2755-61.
 172. Sharpe, A.H., et al., *The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 239-45.
 173. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 141-51.

AGRADECIMIENTOS

“Cuando bebas agua, recuerda la fuente”

Proverbio chino

Thank you so much

Mil gracias

En el Otoño del 2007 empezó la “corta” pero intensa experiencia de mi Tesis Doctoral. Acababa de graduarme en Biología y como desde que era pequeña he tenido mucha curiosidad por entender el funcionamiento del cuerpo humano y siempre me han atraído las cosas pequeñas, ¿qué mejor idea que estudiar en profundidad el funcionamiento de las células?. Al principio todo era nuevo y emocionante, cada día que pasaba aprendía más y más y de este modo pude conocer a mucha gente maravillosa. Tanto a ellos, como a la gente que ya estaba en mi vida, quiero agradecerlos el granito de arena que habéis puesto cada uno para que esta Tesis sea posible. He de admitir que durante estos años no todos los momentos han sido fáciles, la ciencia puede ser muy frustrante, pero sólo voy a hablar de los buenos momentos porque son los únicos que recuerdo ahora gracias a vosotros.

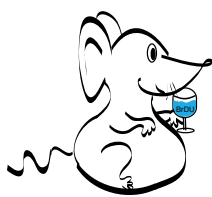
En primer lugar debo agradecer al Dr. Dimitri Balomenos la confianza depositada en mí al haberme permitido realizar esta Tesis en su grupo. Gracias por toda la ayuda prestada, por preocuparte por mí en los momentos importantes de mi carrera. Sobre todo valoro tu ayuda para ver la luz al final del túnel cuando estaba perdida entre resultados o textos. Espero haber aprendido de ti que siempre hay un lado positivo, y que lo último que se pierde es la esperanza.

Asimismo, debo agradecer Dr. Carlos Martínez su tutela y su ayuda para conseguir los medios para poder realizar esta Tesis.

Por todos los conocimientos transmitidos y la ayuda prestada para realizar algunos de los experimentos de esta Tesis, debo dar las gracias a las personas que han pasado por el 412 durante estos años: Chilly, Marianna, Lidia, María Lozano, Gorjana, Adri, Dan, etc. En especial, quería agradecer su amabilidad, apoyo y amistad a Katy. Ha sido un auténtico placer conocerte y has contribuido a hacer el final de mi tesis mucho más llevadero, sé que nuestra amistad durará muchos años.

Ha sido un orgullo trabajar en el DIO, porque todo el personal (Antonio, Coral, Katy) me ha tratado siempre como si estuviese en mi propia casa y además siempre he podido cruzar saludos y sonrisas así como compartir consejos, reactivos, cañas y cenas con mucha gente genial de otros laboratorios: Abel, Vicens, Chechu y Javi 413, David y Paloma 418, Carlos, Elena, Didier y Patri 412, Sara 411, Tere y Roberto 16, Rosa, Ali y Araceli 415, María, Pedro y Denise 414, Borja, Julia y Laura 416, Juan Carlos, Pili de Biología (gracias por las correcciones), etc.

Tanta y tantas horas y fines de semana pasados en ese aparato al que al final hasta le terminas cogiendo cariño, aunque la primera vez que le conoces te parece una “máquina infernal”: el citómetro. Muchas gracias a Maricarmen y a Sara por pasar muchas de estas horas conmigo y enseñarme tanto haciéndome estos ratos más amenos con unas risas, así da gusto trabajar.



¿Qué hubiese sido de mis ratoncitos, los protagonistas de esta tesis, sin el duro trabajo de la gente del animalario? Gracias a Antonio, Lucio y Raquel, por el buen trabajo que habéis llevado a cabo y por vuestra amabilidad y disponibilidad. Ha sido un placer trabajar con vosotros.

I am very grateful to Dr. Abul Abbas, MD, and Hans Doms, Ph.D., for allowing me to have one of the most wonderful experiences in my life (if not the best) in the University of California, San Francisco. I learned so much during the 6 months that I spent there and I made many good friends (Iris, Sara, Mike, Laura, Alberto, Ty, Amelie, Claudio, Romain, Rudd, Harvey, Rich, Dana, Maricar, etc) that I will never forget this experience. Thanks guys, I miss you.

Una de las mejores cosas de estos años ha sido, sin duda, poder conocer a grandes personas del DIO que al final se han convertido en grandes amigas, me refiero a Maitane, María y Bea. Muchas gracias chicas, por todo vuestro apoyo, por escucharme tantas veces cuando he ido a buscaros a vuestro "bench" y porque siempre habeis tenido un hueco para animarme cuando lo necesitaba. Además, fuera del CNB hemos disfrutado muchas fiestas e increíbles viajes que nunca olvidaré. Sin vosotras esta Tesis no hubiese sido ni la mitad de especial. A las que os vais lejos, os estaré esperando, porque algún día nos volveremos a juntar, aquí o allí.

Por supuesto, gracias a los amigos que han ido llegando por el camino por amenizarme estos años: Mario, Dani, Sergio, Koldo, Ríos (Javier), Carlos, Adri, María, Cova, Nata, Marta, Juanma, Glenn, etc, lo hemos pasado genial juntos. En especial debo dar las gracias a mis grandes amigas de toda la vida Lu y Noe, por estar siempre a mi lado en los momentos buenos y, sobre todo, en los malos.

No hace falta decir que este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres, muchas gracias por estar ahí cuando os necesitaba, y creer en mí. Siempre me habéis apoyado y ayudado en todo lo que he querido hacer en mi vida. Sólo espero haberos hecho sentir orgullosos de mí, hoy y siempre.

Gracias a Dana por darme tanto cariño y felicidad y a Barney, uno de los momentos más difíciles de mi vida fue sufrir tu pérdida.

Por último, me gustaría agradecer todo su apoyo y cariño a Carlitos, mi Carlitos. Siempre has estado allí, apagando todos mis miedos y compartiendo conmigo cada momento de mi vida durante los últimos...¿8 años?. Me has escuchado, animado y sobre todo has hecho lo que más me gusta de ti: sacarme una sonrisa sincera dándome todo tu amor. Gracias por seguirme hasta el fin del mundo, yo también te seguiré hasta donde haga falta. Estoy segura, juntos alcanzaremos todos nuestros sueños.

Si al principio he definido a este período de mi vida como "corto" es porque, al mirar atrás, tengo la

sensación de que el tiempo ha pasado demasiado rápido porque he disfrutado al máximo con lo que he hecho durante estos años, no sólo a nivel profesional, si no también a nivel personal. Me siento muy agradecida por haber tenido esta experiencia con gente tan maravillosa. Siempre sentiré nostalgia cuando mire hacia atrás.

Mil gracias a todos

